HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	創傷治癒における皮膚幹細胞の系譜細胞は毛包の発生を停止させながら表皮下水疱を治癒させる
Author(s)	藤村, 悠
Description	配架番号：2651
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14710号
Issue Date	2021-09-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14710
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/83037
Type	doctoral thesis
File Information	Yu_Fujimura.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

創傷治癒における皮膚幹細胞の系譜細胞は

毛包の発生を停止させながら表皮下水疱を治癒させる

（Hair follicle stem cell progeny heal blisters

while pausing hair development）

2021 年 9 月

北　海　道　大　学

藤　村　　悠

学　位　論　文

創傷治癒における皮膚幹細胞の系譜細胞は

毛包の発生を停止させながら表皮下水疱を治癒させる

（Hair follicle stem cell progeny heal blisters

while pausing hair development）

2021 年 9 月

北　海　道　大　学

藤　村　　悠

目　　次

発表論文目録および学会発表目録　・・・・・・　１頁

要旨　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　２頁

略語表　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　４頁

諸言　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　５頁

方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　７頁

結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　１２頁

考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　５０頁

結論　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　５３頁

謝辞　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　５４頁

利益相反　・・・・・・・・・・・・・・・・・・　５５頁

引用文献　・・・・・・・・・・・・・・・・・・　５６頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Fujimura, Y., Watanabe, M., Ohno, K., Kobayashi, Y., Takashima, S., Nakamura, H., Kosumi, H., Wang, Y., Mai, Y., Lauria, A., Proserpio, V., Ujiie, H., Iwata, H., Nishie, W., Nagayama, M., Oliviero, S., Donati, G., Shimizu, H., Natsuga, K.
   Hair follicle stem cell progeny heal blisters while pausing skin development
   EMBO Rep. *22*, e50882, 2021

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Fujimura, Y., Natsuga, K., Watanabe, M., Iwata, H., Nishie, W., Nakamura, H., Nagayama, M., Donati, G., Shimizu, H.
   Selective epidermal removal is a robust platform for understanding context-dependent epithelial cell activation
   49th Annual Meeting of European Society for Dermatological Research, Sep. 2019, Bordeaux, France

2. Fujimura, Y., Natsuga, K., Watanabe, M., Iwata, H., Nishie, W., Nakamura, H., Nagayama, M., Donati, G., Shimizu, H.
   In vivo selective removal of the epidermis unveils the dynamics of epithelial wound healing
   44th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Nov. 2019, Aomori, Japan

3. Fujimura, Y., Watanabe, M., Ohno, K., Kobayashi, Y., Takashima, S., Nakamura, H., Kosumi, H., Wang, Y., Mai, Y., Lauria, A., Proserpio, V., Ujiie, H., Iwata, H., Nishie, W., Nagayama, M., Oliviero, S., Donati, G., Shimizu, H., Natsuga, K.
   Hair follicle stem cell progeny repair subepidermal blisters at the expense of skin development
   45th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Dec. 2020, Virtual Meeting

要旨

【背景と目的】　成長の完了した組織が損傷を受けると、発生期の遺伝子発現プログラムが再活性化し、組織を修復する。しかし、発生期にある成長段階の組織損傷がどのように修復されるかは不明であった。また、従来の創傷治癒アッセイに用いられる皮膚全層創傷モデルでは、皮膚付属器を含む上皮成分が創床から失われるため、創傷治癒と発生の両者を同時に観察することは不可能であった。本研究の目的は、発生期のマウスの表皮下水疱モデルを用いて、表皮の選択的損傷が皮膚の発生に与える影響を調べることである。

【材料と方法】　サクションブリスター法を新生仔マウスの背部皮膚に応用し、創傷部に発生期の毛包を含む表皮下水疱モデルを作成した。野生型マウス、*Col17a1*$^{-/-}$マウス（17 型コラーゲンノックアウトマウス）、*Col7a1*$^{-/-}$マウス（7 型コラーゲンノックアウトマウス）などの遺伝子改変マウス、$CaCl_2$を水疱内に投与したマウス、ヒトの水疱検体の表皮下水疱の治癒過程を免疫蛍光染色、免疫組織化学、電子顕微鏡を用いて詳細に観察した。RNA シーケンシングを用いて、表皮下水疱の再生上皮における発生に関わる遺伝子群の発現変化を解析した。系統追跡実験、細胞増殖標識、数理モデルを組み合わせ、接合部毛包幹細胞および毛包間表皮幹細胞の動態を解析した。

【結果】　野生型マウスの表皮下水疱では水疱部の真皮内に発生期の毛包が残存し、創傷治癒と毛包付属器の発生の同時観察に適したモデルであることを確認した。電子顕微鏡で表皮下水疱の水疱蓋にはヘミデスモソームが、水疱底には lamina densa が観察され、lamina lucida で裂隙が形成されていた。水疱形成の 1 日後には 1-2 層の再生上皮が確認でき、3 日後には顆粒層を伴って上皮化が完了した。表皮下水疱の再生上皮の RNA シーケンシングでは、Wnt シグナル、メラニン形成、Hedgehog シグナルなどの毛包の発生に関わる遺伝子の発現の低下が見られた。水疱形成の 3 日後の病変部ではステージ 5 または 6 の発生段階の毛包が観察されたが、正常皮膚の毛包にはステージ 7 の毛包も観察されいることから、水疱形成によって毛包の成長は遅延することが判明した。これと一致して、また、Wnt レポーターマウスでは水疱部の毛包における Wnt シグナル活性が低下していた。水疱部における増殖細胞は、毛包角化細胞および水疱辺縁部の表皮角化細胞に豊富であり、毛包および水疱辺縁部から遊走する角化細胞が観察された。水疱形成の 1 日後および 3 日後の水疱部に浸潤する免疫細胞（CD3、F4-80、Ly6G で標識）は、正常部皮膚と比較して同程度であった。野生型マウスの表皮下水疱の系統追跡法では、再上皮化には Lrig1（Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1）で標識された接合部毛包幹細胞の系譜細胞が大きく寄与し、K14（ケラチン 14）で標識された毛包間表皮幹細胞の寄与は水疱辺縁部の上皮化のみに留まった。*Col17a1*$^{-/-}$マウスに表皮下水疱を作成したところ、野生型マウス

と同様、裂隙は lamina　lucida で形成されたが、水疱部からほとんどの毛包が剥離した。毛包の減少に伴って上皮化は遅延し、対照マウスで上皮化が完了する水疱形成の 3 日後には顆粒層の再生が見られなかった。*Col17a1*$^{-/-}$マウスにおけるヒト COL17 の過剰発現によるトランスジェニックレスキューでは、水疱形成の 3 日後の再生上皮に顆粒層の再生が確認でき、水疱治癒を改善していた。*Col17a1*$^{-/-}$マウスの表皮下水疱の系統追跡法では、水疱辺縁の K14 で標識された毛包間表皮幹細胞の系譜細胞が上皮化に大きく寄与した。*Col7a1*$^{-/-}$マウスに表皮下水疱を作成したところ、野生型マウスや*Col17a1*$^{-/-}$マウスとは対照的に、裂隙形成は基底膜下で生じていた。さらに、*Col17a1*$^{-/-}$マウスとは対照的に毛包が真皮内に残存した。水疱部の毛包の増殖細胞数は対照マウスと同程度であったが創傷治癒は遅延しており、再生上皮の角化細胞の遊走における扁平化が対照マウスと比較して小さく、創傷治癒遅延と相関していた。$CaCl_2$ 投与マウスの表皮下水疱では水疱形成 1 日後の再生上皮が対照マウスより少なく、創傷治癒が遅延していた。水疱部の毛包の増殖細胞数は対照マウスと同程度であったが、再生上皮の角化細胞の遊走における扁平化が対照マウスと比較して小さく、創傷治癒遅延と相関していた。野生型マウス、*Col17a1*$^{-/-}$マウス、*Col7a1*$^{-/-}$マウスおよび $CaCl_2$ 投与マウスの in vivo の創傷治癒過程における細胞増殖や細胞形態の扁平化率等のデータを用い、数理モデルで可視化し、表皮下水疱における接合部毛包幹細胞および毛包間表皮幹細胞の動態を再現、比較した。ヒトの水疱検体でも水疱部の毛包から再上皮化していることを確認した。

【考察】　本研究では、これまで詳細にわかっていなかった創傷治癒と組織発生の関わりにおける重要な細胞メカニズム、および in vivo の創傷治癒における遊走細胞の形態学的変化の重要性を解明した。我々のサクションブリスターモデルは、上皮のみを剥離することによって in vitro の創傷治癒アッセイにも類似し、in vivo の創傷治癒における上皮細胞の観察に非常に有用である。また、表皮水疱症、類天疱瘡群、熱傷、スティーブンス・ジョンソン症候群/中毒性表皮壊死症などの疾患と病理学的に同等の表皮化水疱を再現できるため、これらの疾患の病態の解明に寄与する可能性がある。また、特に *Col17a1*$^{-/-}$マウスおよび *Col7a1*$^{-/-}$マウスの水疱形成は、それぞれヒトの接合部型および劣性栄養障害型の表皮水疱症表皮水疱症の創傷モデルマウスとなり得る。さらに、水疱内投与実験は水疱内への直接の薬剤投与を可能にする。本研究の成果は、水疱性疾患の病態解明、治療開発に繋がることが期待される。

【結論】　我々は、成長段階の皮膚において、接合部毛包幹細胞の系譜細胞が毛包の成長を犠牲にして表皮下水疱を治癒させることを見出した。また、再生上皮における細胞の扁平化は創傷治癒を促進させる重要な因子である。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

AP	Alkaline phosphatase
BM	Basement membrane
COL17	Type XVII collagen
COL7	Type VII collagen
COL4	Type IV collagen
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
FITC	Fluorescein isothiocyanate
H&E	Hematoxylin and eosin
ITGA6	α6 integrin
K10	Keratin 10
K14	Keratin 14
LOR	Loricrin
Lrig1	Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1
L332	Laminin 332
PCK	Pan-cytokeratin
PH3	Phospho-Histone H3
PI	Propidium iodide
P1	Postnatal day 1
WT	Wild type

諸言

ヒトの組織が損傷に反応する際、その細胞成分と細胞外マトリックスを恒常状態から再生状態に変換する。損傷した組織は通常、上皮において胎生期の遺伝子発現プログラムを再活性化して組織再生を加速する（Fernandez Vallone et al., 2016; Miao et al., 2019; Nusse et al., 2018; Yui et al., 2018）。しかし、損傷より以前に胎生期の遺伝子発現プログラムが活性化している発生期の組織の損傷においても、この現象が当てはまるかどうかは不明である。

表皮は皮膚の重層扁平上皮であり、体の表面に位置して外部からの刺激や微生物に対するバリアとして機能する（Natsuga, 2014）。表皮の幹細胞が存在する表皮基底層における細胞増殖と分化は、表皮の完全性を維持するために微調整される（Donati and Watt, 2015）。表皮は、表皮基底膜領域のタンパクを介して真皮に付着し（McMillan et al., 2003）、表皮基底膜領域タンパクは表皮幹細胞のニッチとして機能する（Watt and Fujiwara, 2011）。このため、α6 インテグリン（α6 integrin; ITGA6）、β1 インテグリン、17 型コラーゲン（type XVII collagen; COL17）などのタンパクが失われると、表皮幹細胞の維持機構が不安定となり、一過性の表皮増殖が生じる（Brakebusch et al., 2000; Niculescu et al., 2011; Watanabe et al., 2017）。

毛は触覚装置として知覚神経の補助的役割を持つほか、外力や光線からの保護、低温や高温からの保温を担っている。毛包は毛を取り囲む多層の角化細胞で構成され、皮膚面から斜めに陥入し、表皮から真皮、皮下脂肪織に位置する。毛や毛包を維持する幹細胞は、毛包の様々な部位に異なる細胞群として存在し（図 A）、毛器官の維持に関わるだけでなく、脂腺や表皮などへの多分化能を有する（Dekoninck and Blanpain, 2019）。

皮膚の創傷は全人類が経験するものであり、疼痛を伴うとともに細菌感染の母地となる。皮膚の創傷を修復する細胞の供給源については、実験動物を用いて広く調べられてきた（Dekoninck and Blanpain, 2019; Rognoni and Watt, 2018）。結果として、毛包、表皮付属器、線維芽細胞、および免疫細胞が協調して創傷治癒に関わり、各成分の寄与の度合いはアッセイによって結果が異なることがわかっている（Garcin et al., 2016）。興味深いことに、成体皮膚の創傷は、SOX11 および SOX4 を含む、表皮の発生を調節する遺伝子の発現を誘導することが報告されている（Miao et al., 2019）。

従来、皮膚創傷アッセイとして、表皮、表皮付属器、真皮、および皮下脂肪組織を含むすべての皮膚成分が除去される全層皮膚創傷が用いられてきた。従来の全層皮膚創傷とは対照的に、表皮下水疱によって例示されるような表皮剥離は、表皮下の構造に影響を及ぼさない点で特徴的である。熱傷（Chetty et al、1992）、表皮基底膜タンパクの先天性欠損（表皮水疱症）（Fine et al., 2014; Vahidnezhad et al., 2019）、これらのタ

ンパクに対する自己免疫（類天疱瘡群）（Schmidt and Zillikens., 2013）、およびスティーブンス・ジョンソン症候群/中毒性表皮壊死症などの重症薬疹（White et al., 2018）など疾患で表皮は真皮から剥離し、表皮が選択的に損傷を受ける。全層皮膚創傷の修復に寄与する細胞群については先行研究で同定されているが（Aragona et al., 2017; Dekoninck and Blanpain, 2019; Donati et al., 2017; Gonzales and Fuchs, 2017; Ito et al., 2005; Kang et al., 2020; Page et al., 2013; Park et al., 2017; Sada et al., 2016）、表皮下水疱の治癒における細胞動態は全くわかっていない。さらに、全層皮膚創傷は、発生期の皮膚に適用される場合、組織の再生と発生を区別することができない。対照的に表皮下水疱では、同じ創床における皮膚再生（表皮の再上皮化）と形態発生（毛包の発生）の両方を同時に観察することが可能である。

本研究の目的は、マウスの発生期の毛包を含む表皮下水疱の治癒過程を詳細に観察することで、皮膚の発生と再生のバランスのメカニズムを明らかにし、治癒に関わる幹細胞群を同定することである（図 B）。さらに、表皮下水疱を呈する疾患の治療、創薬に繋がることを期待する。

本研究では、表皮下水疱モデルを利用し、発生組織への損傷の影響について実験を進めた。表皮下水疱では、再生上皮における組織形態発生に関与する遺伝子の発現が低下し、毛包間表皮幹細胞よりも主に接合部毛包幹細胞を誘導して毛包の発生を停止させながら創傷を治癒すること、毛包幹細胞が減少した場合には毛包間表皮幹細胞が代償的に創傷を治癒することを見出した。また、再生上皮における角化細胞の形態学的変化が再上皮化に重要な因子であることを明らかにした。さらに、数理モデルを用いて表皮下水疱の創傷治癒過程のシミュレーションを可能にした。

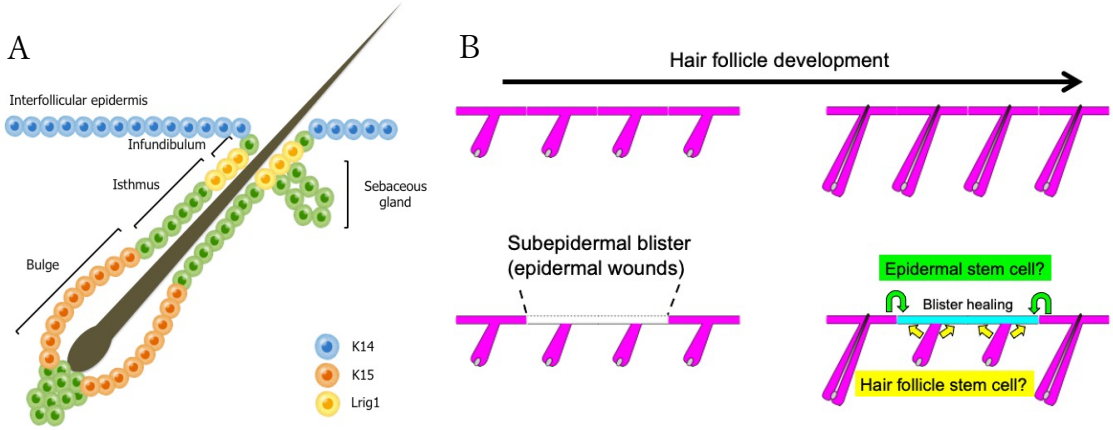


図 A　皮膚における上皮幹細胞の分布

ケラチン 14（K14）陽性の毛包間表皮幹細胞、Lrig1（Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1）陽性の接合部毛包幹細胞、K15 陽性の毛包バルジ幹細胞などがある。

図 B　本研究の目的

方法

【実験動物】

C57BL/6 マウスは Clea（東京、日本）から購入した。Ins-Topgal +マウスは理研バイオリソース（つくば、日本）から（Moriyama et al., 2007）、 K14CreER（K14; keratin 14）、Lrig1CreER（Lrig1; Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1）、および R26R-confetti マウスは、ジャクソンラボラトリー（Bar Harbor, Maine, USA）から、R26R-H2B-mCherry マウスは、理研（神戸、日本）から購入した。*Col17a1*$^{-/-}$および hCOL17+;*Col17a1*$^{-/-}$マウスは、既報告通り作成した（Nishie et al., 2007）。*Col7a1*$^{-/-}$マウスは、Jouni Uitto 教授から供与された（Heinonen et al., 1999）。 以下の動物実験は北海道大学大学院医学研究科の機関審査委員会の承認を得て北海道大学動物実験に関する規程に従って行った。

【サクションブリスター法】

注射器とコネクターチューブを用いて生後 1 日目（P1; postnatal day 1）の新生仔マウスの背部皮膚に陰圧をかけて表皮下水疱を作成した。皮膚にかかる陰圧は 523.4±1.3mmHg であった（Ex Pocket Pressure Indicator PM-281（AS ONE、大阪、日本）で評価した）。皮膚に取り付けた注射器の孔の直径は 4mm であり、典型的な水疱のサイズは直径 3mm であった。

【組織学】

マウスの背部皮膚検体をホルマリンで固定、脱水後にパラフィンに包埋、または optical cutting temperature compound に包埋してドライアイス上で凍結した。凍結切片は、4%パラホルムアルデヒドまたは冷アセトンで固定、あるいは固定せずに染色に使用した。ホルマリン固定パラフィン包埋切片は、脱パラフィン後、クエン酸バッファー（pH 6.0）または EDTA バッファー（pH 9.0）による抗原賦活化を行った。これらの切片に一次抗体を加え、4°Cで一晩インキュベートした。リン酸緩衝生理食塩水で洗浄した後、切片を FITC（fluorescein isothiocyanate）、Alexa 488、Alexa 647、または Alexa 680 の結合した二次抗体とともに室温で 1 時間インキュベートした。核染色にはヨウ化プロピジウム（propidium iodide; PI）または 4',6-diamidino-2-phenylindole（DAPI）を用いた。染色された免疫蛍光標本は、共焦点レーザー走査顕微鏡（FV-1000（オリンパス、東京、日本）または LSM-710（Zeiss, Oberkochen, Germany））を使用して観察した。

免疫組織化学には、horseradish peroxidase 付き二次抗体を使用した。切片を過酸化水素でブロッキングし、抗体で標識してヘマトキシリンで対染色した。形態解析のた

めに、脱パラフィンした切片を従来の方法でヘマトキシリンおよびエオジン（hematoxylin and eosin; H＆E）で染色した。アルカリホスファターゼ染色は、StemAb Alkaline Phosphatase Staining Kit II（Stemgent, San Diego, California, USA）を使用して行った。免疫組織化学および H＆E およびアルカリホスファターゼ（Alkaline phosphatase; AP）で染色した切片を BZ-9000 顕微鏡（キーエンス、東京、日本）で撮影した。

ホールマウント染色では、マウスの背部皮膚サンプルを 4%パラホルムアルデヒドで固定し、免疫標識または Alkaline Phosphatase Staining Kit II で染色した。 ins-Topgal+ マウス皮膚の X-gal 染色には、Beta-Galactosidase Staining Kit（タカラバイオ、滋賀、日本）を使用した。背部皮膚サンプルを 4%パラホルムアルデヒドで 4℃、1 時間で固定し、染色液に室温で一晩インキュベートした。組織は Mowiol 溶液で封入した。LSM-710、FV-1000 または BZ-9000 顕微鏡で画像を観察した。

毛包のステージ分類は以下の文献を用いて評価した（Paus et al., 1999; Saxena et al., 2019）。 定常状態あるいは再生上皮における角化細胞の長軸の長さは、K14 で染色した切片で ImageJ（NIH, Bethesda, Maryland, USA）を用いて測定した。特定のマーカーで標識された細胞の定量化は、複数の病変部から ImageJ を用いて行った（Natsuga et al., 2016）。

【抗体】

本研究では以下の抗体を使用した。抗 BrdU（bcam, Cambridge, UK; BU1/75, Dako; M0744）、抗リン酸化ヒストン H3（Ser10）（Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA）、抗ロリクリン（Covance, Princeton, New Jersey, USA）、FITC 結合抗 CD3e（BioLegend, San Diego, California, USA; 145-2C11）、Alexa Fluor488 結合抗 F4 / 80（Affymetrix, Santa Clara, California, USA; BM8）、FITC 結合抗 Ly-6G（Beckman Coulter, Brea, California, USA; RB6-8C5）、抗 COL4（Novus Biologicals, Centennial, Colorado; NB120-6586）、抗 COL7（homemade（Iwata et al, 2013））、抗 COL17（Abcam; ab186415）、抗 ITGA5（Abcam; EPR7854）、抗 ITGA6（BD Biosciences Pharmingen, San Diego, California, USA; GoH3）、抗ラミニン 332（laminin 332; L332）（Abcam; ab14509）、抗ラミニンβ1（Abcam; ab44941）、抗パンサイトケラチン（pan-cytokeratin; PCK）（PROGEN, Wieblingen, Heidelberg, Germany; PRGN-10550）、抗ケラチン 10（keratin 10; K10）（Biolegend; Poly19054）、抗サイトケラチン 14（keratin 14; K14）（ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA; LL002）。

【BrdU 標識】

増殖解析のため、マウスを安楽死する 4 時間前に 1 個体あたり 10μg の BrdU（BD

Biosciences Pharmingen）を腹腔内投与した。

【電子顕微鏡】

サンプルは、サクションブリスターを行った直後の C57BL/6 マウス背部皮膚（P1）から採取した。5%グルタルアルデヒド溶液で固定し、1%OsO_4 で後固定し、脱水して Epon812 に包埋した。包埋したサンプルを光学顕微鏡用に 1μm の厚さに切断し、電子顕微鏡用に薄切片にした（70 nm 厚）。 薄切片を酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色し、透過型電子顕微鏡（H-7100; 日立、東京、日本）で観察した。

【系統追跡法】

P0 の K14CreER:R26R-H2B-mCherry 、 Lrig1CreER:R26R-H2B-mCherry 、K14CreER:R26R-confetti、Lrig1CreER：R26R-confetti マウスに 0.5 mg のタモキシフェン（T5648; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA）を腹腔内投与した。P1 でサクションブリスター法を用いて背部皮膚に表皮下水疱を作成し、P4 サンプルを採取した。

【RNA シーケンシングと解析】

表皮遺伝子発現への概日リズムの影響を除外するため（Janich et al., 2013)、サクションブリスター検体とコントロール検体を同じ時刻に P2 で採取した。皮膚サンプルを 0.25%トリプシン EDTA により、4°Cでオーバーナイト処理した。水疱部表皮と再生上皮を真皮から剥離して収集し、メスで細かく刻んで 10%FCS/DMEM に懸濁した。細胞懸濁液を 70μm 径のフィルターでろ過し、細胞ペレットを回収した。ライブラリーの調製は、Illumina TruSeq RNA prep kit を使用した。TRIzol 抽出と化学的断片化の後、mRNA をオリゴ dT が付いた磁気ビーズで単離し、cDNA に逆転写した。DNA ポリメラーゼ I と RNAse H を使用して second strand DNA を合成し、得られた cDNA に末端修復、A テーリング、アダプターライゲーションを行った。精製と PCR による濃縮を行い、ライブラリーを AMPure XP ビーズで精製し、NextSeq500 Illumina シーケンサーで解析した。

品質管理を行った後、raw read を NCBIm37 マウスリファレンスゲノム（mm9）にアラインメントした。遺伝子発現レベルは、RefSeq 遺伝子アノテーションと featureCounts（Liao et al., 2014）を使用して定量化し、TPM として正規化した。発現差異解析は、edgeR（Robinson et al., 2010）を使用して行った。低発現遺伝子（2 つ未満のサンプルで 100 万リードあたり 1 カウント）をフィルターで除去した後、水疱群と対照群を比較した（Robinson et al., 2010)。遺伝子発現プロファイルの階層クラスタリングには、ユークリッド距離と完全連結法のみを使用し、発現差のある遺伝子

に対して行った。clusterProfiler R/Bioconductor（Yu et al., 2012）を使用し、発現差のある遺伝子の GO term、KEGG 経路エンリッチメント解析、および GO term ネットワークの視覚化を行った。エンリッチメントされた経路を検証するために、GSEA 解析を行った。

【水疱内投与】

10μl のリン酸緩衝食塩水に希釈した 1.8mM または 9.0mM $CaCl_2$ を、サクションブリスター法による水疱作成の直後に水疱内に注射器を用いて投与した。

【統計】

統計解析は、GraphPad Prism（GraphPad Software, La Jolla, California, USA）を使用して行った。P 値は、t 検定または一元配置分散分析（ANOVA）を行った後に Tukey 検定を使用して決定した。P 値は * 0.01<P<0.05、** 0.001<P<0.01、*** 0.0001<P<0.001、**** P<0.0001 として示した。グラフは平均±標準誤差（standard errors; SE）、バイオリンプロット、または個々のマウスの値を線分で繋いで図示した。

【数理モデル】

表皮細胞の動態を表す数理モデル（Kobayashi et al., 2016; Kobayashi et al., 2018）を表皮創傷治癒のシミュレーションのために応用した。このモデルでは、表皮基底細胞は、直径が 10 μm の球状粒子として表される。毛包間表皮幹細胞として指定された細胞とその系譜細胞は、基底膜上で分裂することができる。細胞分裂は、最初は完全に重なり合っていた 2 つの粒子が、徐々に 2 つの異なる粒子に分離するプロセスとして表現した。新しく作られた細胞が他の細胞に完全に囲まれていない場合、再生上皮であると判断し、実験データに合わせて長軸が 2 倍（野生型マウス）または 1.5 倍（*Col7a1*$^{-/-}$マウス及び $CaCl_2$ 投与マウス）に増加した扁球状に変化させた。その際、体積は一定に保たれるように設定した。同じ分裂率がすべての増殖細胞に割り当てられ、平均分裂時間は 57.6 [arb. unit]とした。細胞に加えられる力は、他の細胞や基底膜との接着と排除体積相互作用から生じる。幹細胞は基底膜と結合して分離できないが、幹細胞から生まれた系譜細胞の基底膜への結合は弱いため、周囲の圧力によって基底膜から分離する。基底膜から分離した細胞はシステムから除去される設定とした。基底膜は硬い平らな面であると見なし、その形状は時間の経過とともに変化しないものとした。シミュレーション領域は、周期境界条件を用いて水平方向に 600 μm x 600 μm に設定した。表皮下水疱治癒のシミュレーションの初期条件を用意するために、初めに幹細胞を基底膜に配置し、系譜細胞が表面全体を覆うまでシミュレーションを実行した。次に、系譜細胞を非増殖性に設定し、場の中央部の直径 480 μm の円内の範囲にあっ

た細胞を除去することで表皮欠損を作成した。

【ヒト検体】

先天性または自己免疫性表皮水疱症患者皮膚の H&E 染色標本（表皮水疱症 73 検体、水疱性類天疱瘡 180 検体）から、以下の組織学的基準を満たすサンプルを選択した：(1) 表皮下水疱または表皮真皮接合部での皮膚剥離 (2) その領域に再上皮化が見られる (3) 水疱底に毛包が存在する。水疱性類天疱瘡 3 検体がすべての基準 (Blister-1、2、3) を満たし、Keyence BZ-9000 顕微鏡で観察した。北海道大学大学院医学研究科の施設内倫理審査委員会によって、上記のすべてのヒト研究を承認された（ID：13-043 および 15-052)。 この研究は、ヘルシンキ宣言に従って実施した。参加者またはその法定後見人に書面によるインフォームドコンセントを得た。

【データの利用】

本研究で作成されたデータセットは、次のデータベースで利用できる。

-RNA シーケンシングデータ：Gene Expression Omnibus GSE154871
(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE154871)

結果

1. 表皮下水疱の形成とその治癒過程

サクションブリスター法は、真皮から表皮を選択的に除去するために半世紀以上前に開発され（Kiistala &Mustakallio, 1964, 1967）、ヒトの皮膚欠損を修復するための移植に用いる表皮片の採取に利用されてきた。我々は、サクションブリスター法を新生仔マウスに応用することで、毛包、真皮、皮下脂肪組織を創傷内に維持しながら表皮のみを除去し、創傷と皮膚の発生との直接的な関係を調べることができると考えた。そこで、C57BL/6 野生型（wild type; WT）マウスの新生仔の背部皮膚に一定の陰圧を加え、表皮下水疱を作成した（P1、図 1）。

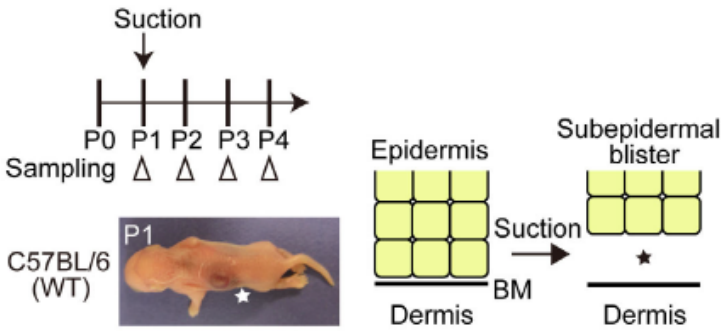


図 1A　サクションブリスター法による水疱形成と検体採取の模式図

P1 の野生型マウス背部皮膚に表皮下水疱を作成し、P1-4 の検体を採取した。WT: wild type, BM: basement membrane。

組織学的に皮膚の剥離は、表皮真皮接合部のレベルで生じていた（図 1B(a)-(d)）。アルカリホスファターゼ染色（AP）陽性の真皮乳頭の位置によって示されるように、毛包は水疱の真皮側に残存した（図 1B(c)）。パンサイトケラチン（PCK）陽性の表皮角化細胞は水疱蓋側に、毛包角化細胞は真皮側に観察され、サクションブリスター法によって表皮が剥離していることを確認した（図 1B(d)）。真皮および皮下組織は、水疱形成後も残存していた（図 1B(a)(b)）。

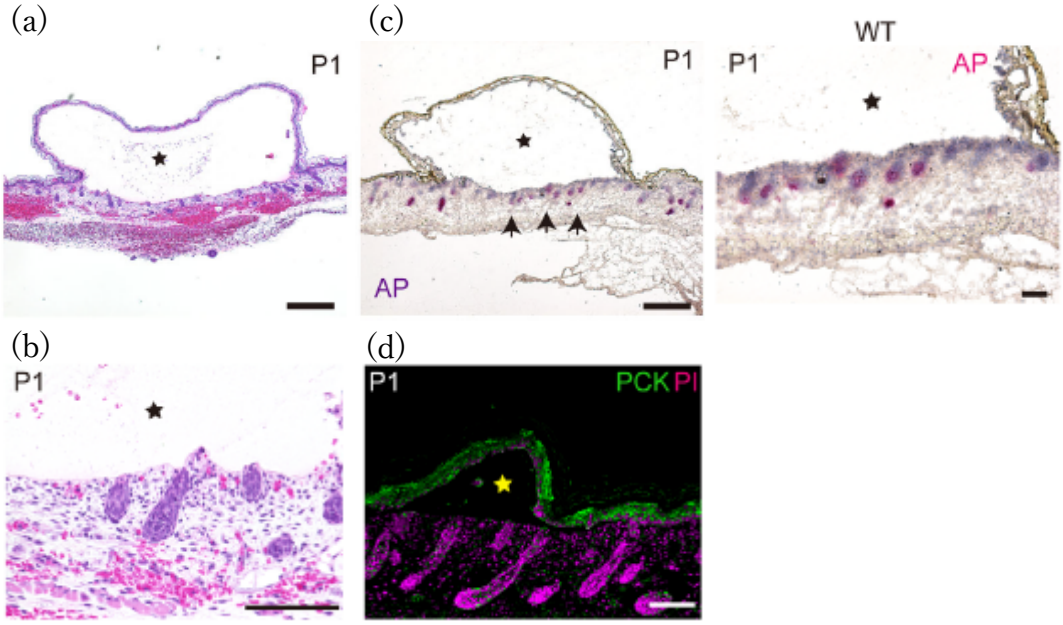


図 1B　野生型マウスの水疱形成

(a) P1 の野生型マウスの水疱の H&E 染色の弱拡大像。星：水疱。Scale bar: 500μm。

(b) (a)の強拡大像。星：水疱。Scale bar: 100μm。

(c)　（左）P1 の野生型マウスの水疱の AP 染色。星：水疱。Scale bar: 500μm。（右）強拡大像。Scale bar: 100μm。

(d) P1 の野生型マウスの水疱の PCK 染色。星：水疱。Scale bar: 100μm。

ヘミデスモソーム構成タンパクであるα6 インテグリン（ITGA6）が水疱蓋に観察されたのに対し、表皮基底膜の主成分である IV 型コラーゲン（COL4）、およびラミニン 332（L332）が水疱底部に観察された（図 1C(a)(b)）。これらの免疫蛍光染色の結果と一致して、電子顕微鏡ではヘミデスモソームは水疱蓋に、lamina densa（基底膜）は水疱底に観察された（図 1C(c)(d)）。これは、ヒトやマウスでの既報告と同様の結果であった（Kiistala &Mustakallio, 1967；Krawczyk, 1971）。

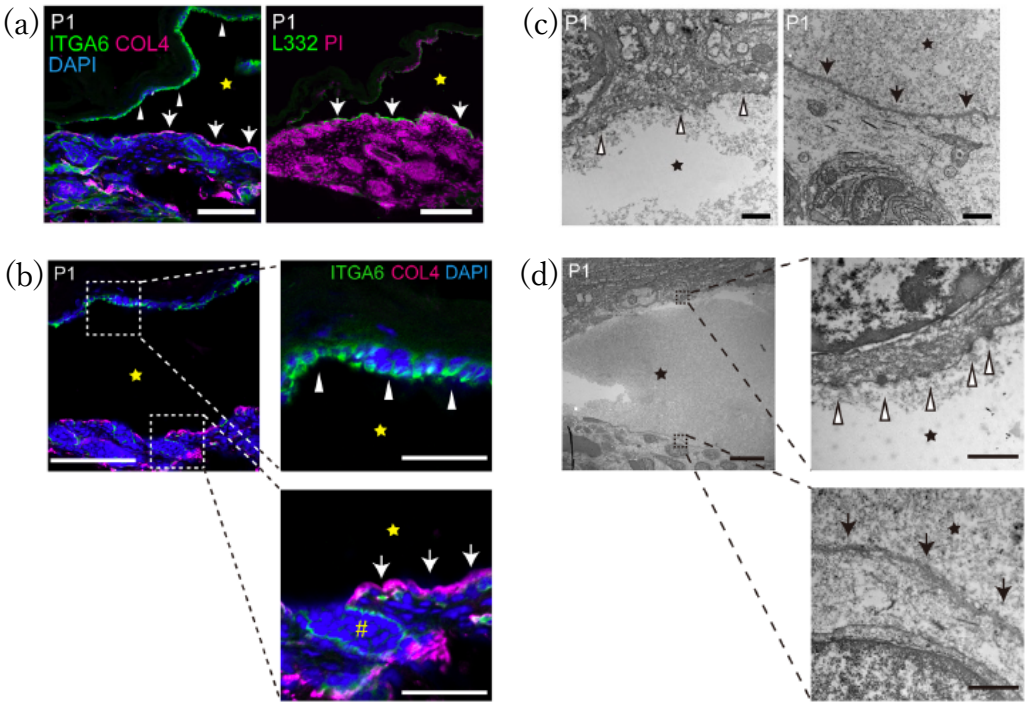


図 1C　野生型マウスの水疱の裂隙のレベル

(a) 野生型マウスの水疱（P1）の α6 インテグリン（ITGA6、矢頭）および IV 型コラーゲン（COL4、矢印）染色（左）。ラミニン 332（L332、矢印）染色（右）。星：水疱。Scale bar: 100μm。

(b) (a)の強拡大像。#：毛包。Scale bar: 100μm(左), 50 μm（右）。

(c) 野生型マウスの水疱（P1）の電子顕微鏡像。白矢頭：ヘミデスモソーム。矢印：lamina densa。星：水疱。Scale bar: 1μm。

(d) (c)の強拡大像。Scale bar: 10μm（左）、1μm（右）。

次に、表皮下水疱の治癒過程の特徴を調べた。水疱形成の 1 日後には水疱底に再生上皮が観察され（P2、図 1D(a)(b)）、パンサイトケラチン（PCK）陽性の 1～2 層の角化細胞が確認できた（図 1D(c)）。また、その再生上皮では、表皮真皮接合部の ITGA6 の発現が回復していた（図 1D(d)(e)）。

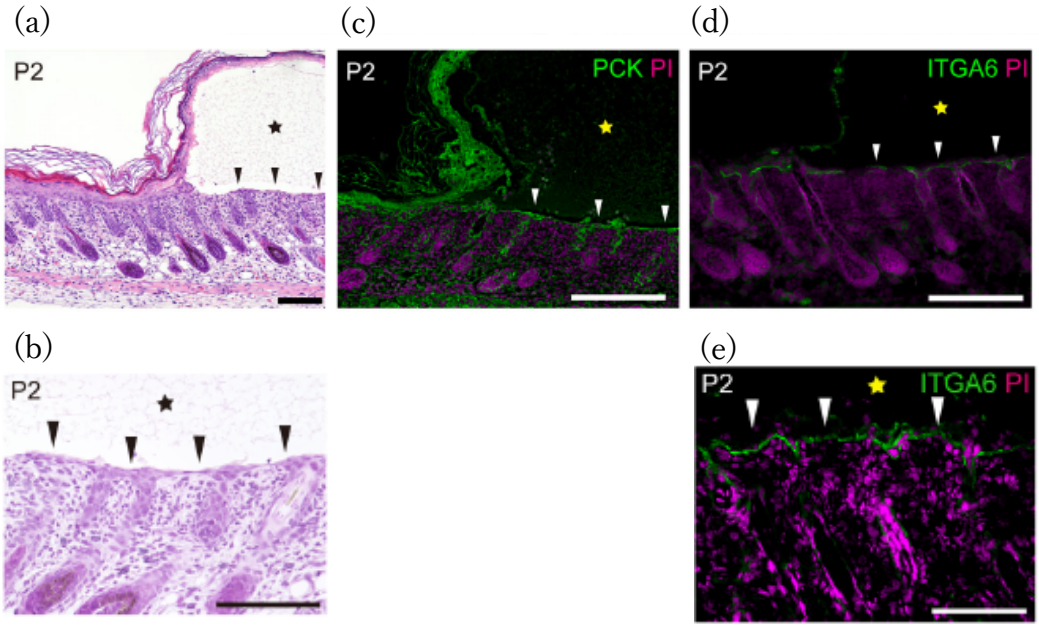


図 1D　野生型マウスの水疱形成の 1 日後の再生上皮

(a) P2 の野生型マウスの水疱の H&E 染色の弱拡大像。矢頭：再生上皮。星：水疱。Scale bar: 500μm

(b) (a)の強拡大像。Scale bar: 100μm。

(c) P2 の野生型マウスの水疱の PCK（矢頭）染色。星：水疱。Scale bar: 100μm。

(d) P2 の野生型マウスの水疱の ITGA6（矢頭）染色。星：水疱。Scale bar: 200μm。

(e) (d)の強拡大像。Scale bar: 100μm。

正常皮膚の基底層の角化細胞の形状は、立方体または円柱状であった（P2、非病変部のケラチン 14（K14）陽性細胞、図 1E(a, b)左)。対照的に、水疱部の再生上皮の角化細胞は、立方体から楔状あるいは平坦な形状に変化した（P2、病変部の K14 陽性細胞、図 1E(a, b)右）(Krawczyk, 1971)。水疱形成の 2 日後（P3)、重層の上皮はほとんど回復したが（図 1E(c))、病変部では、適切な表皮分化の特徴であるロリクリン（loricrin; LOR）陽性の顆粒層が再生していなかった（図 1E(d))。

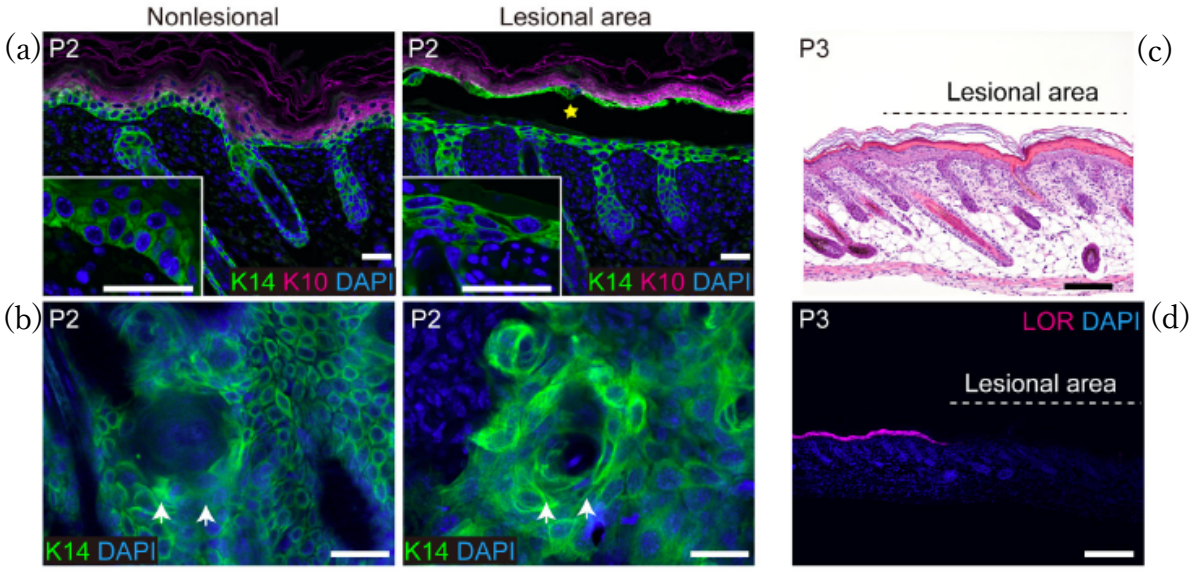


図 1E　野生型マウスの水疱形成の 1 日後の再生上皮角化細胞の形態と 2 日後の再生上皮

(a) P2 の野生型マウスの水疱の非病変部(Nonlesional)および病変部(Lesional area)の K14 (緑) および K10 (マゼンタ) 染色。星：水疱。挿入図：拡大像。Scale bar: 30μm。

(b) P2 の野生型マウスの水疱の非病変部(Nonlesional)および病変部(Lesional area)のホールマウントの K14 染色。矢印：毛孔。Scale bar: 30μm。

(c) P3 の野生型マウスの水疱の H&E 染色。星：水疱。Scale bar: 200μm。

(e) P3 の野生型マウスの水疱の LOR 染色。Scale bar: 200μm。

水疱形成の 3 日後（P4)、再上皮化は完了し（図 1F(a)(b))、表皮分化の最終段階であるロリクリン（LOR）陽性の顆粒層の形成が見られた（図 1F(c))。表皮下水疱の治癒過程の蛍光抗体染色のデータを表 1 に要約する。これらの結果は、新生仔の表皮下水疱が、発生段階における毛包や他の真皮成分に損傷を与えることなく、創傷治癒を視覚化するためのモデルとして有用であることを示すものである。

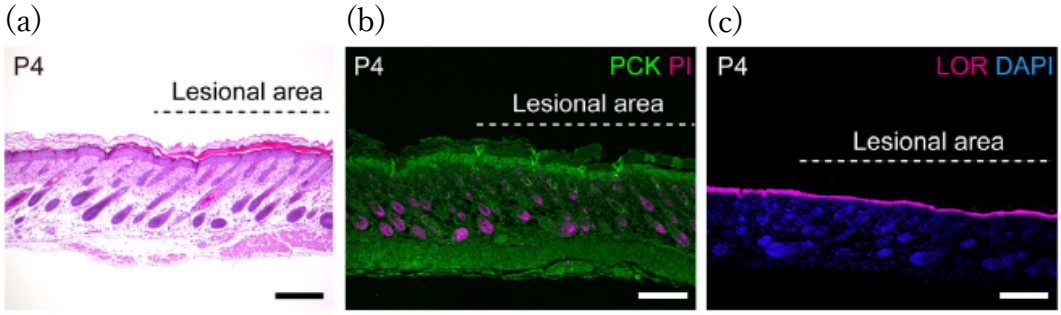


図 1F　野生型マウスの水疱形成の 3 日後の再生上皮

(a) P4 の野生型マウスの水疱の H&E 染色。Scale bar: 200μm。

(b) P4 の野生型マウスの水疱（P4）のパンサイトケラチン（PCK）染色。Scale bar: 200μm。

(c) P4 の野生型マウスの水疱の LOR 染色。Scale bar: 200μm。

表 1　野生型（WT）マウスの水疱における蛍光免疫染色の結果のまとめ

	Timepoint	PCK	K14	K10	LOR	ITGA6	COL4	L332
WT	P1	- (n=4)	- (n=4)	- (n=4)	- (n=4)	- (n=3)	++ (n=3)	++ (n=3)
	P2	+ (n=3)	+ (n=3)	- (n=3)	- (n=3)	++ (n=4)	++ (n=4)	++ (n=4)
	P4 (n=3)	++	++	++	++	++	++	++

PCK：パンサイトケラチン、K14：ケラチン 14、K10：ケラチン 10、LOR：ロリクリン、ITGA6：α6 インテグリン、COL4：4 型コラーゲン、L332：ラミニン 332

2.　皮膚の発生を犠牲にして表皮を修復する

新生仔の皮膚に対する水疱形成の影響を解明するため、水疱形成の 1 日後の再生上皮および水疱蓋の RNA シーケンシングを行った（P2、図 2A(a)(b)）。

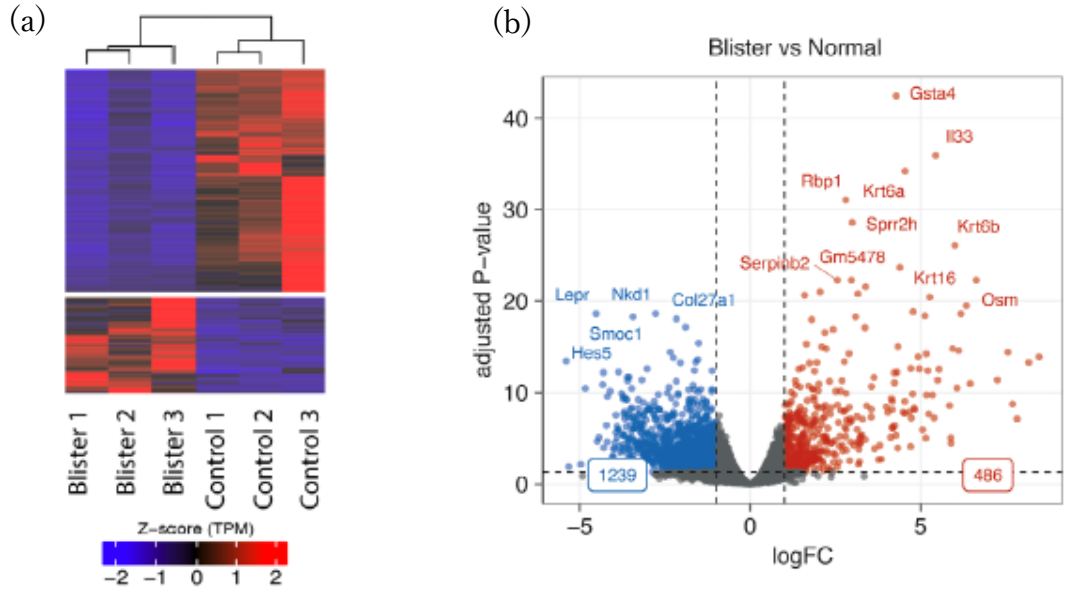


図 2A　表皮下水疱治癒に関する RNA シーケンシング

(a) P2 の病変部表皮と対照マウスの表皮の間で発現差のある遺伝子のヒートマップ（ピアソンの相関）。n=3。

(b) P2 の病変部表皮と対照マウスの表皮の間で発現差のある遺伝子を示すボルケーノプロット。有意に発現上昇あるいは発現低下した遺伝子（| LogFC |> 1;FDR <0.05）を、それぞれ赤と青で示す。

予期せぬことに、Wnt シグナル、メラニン形成、Hedgehog シグナルなどの毛包の発生に関与する遺伝子の発現は、有意に発現低下していた（図 2B(a)-(e)）。

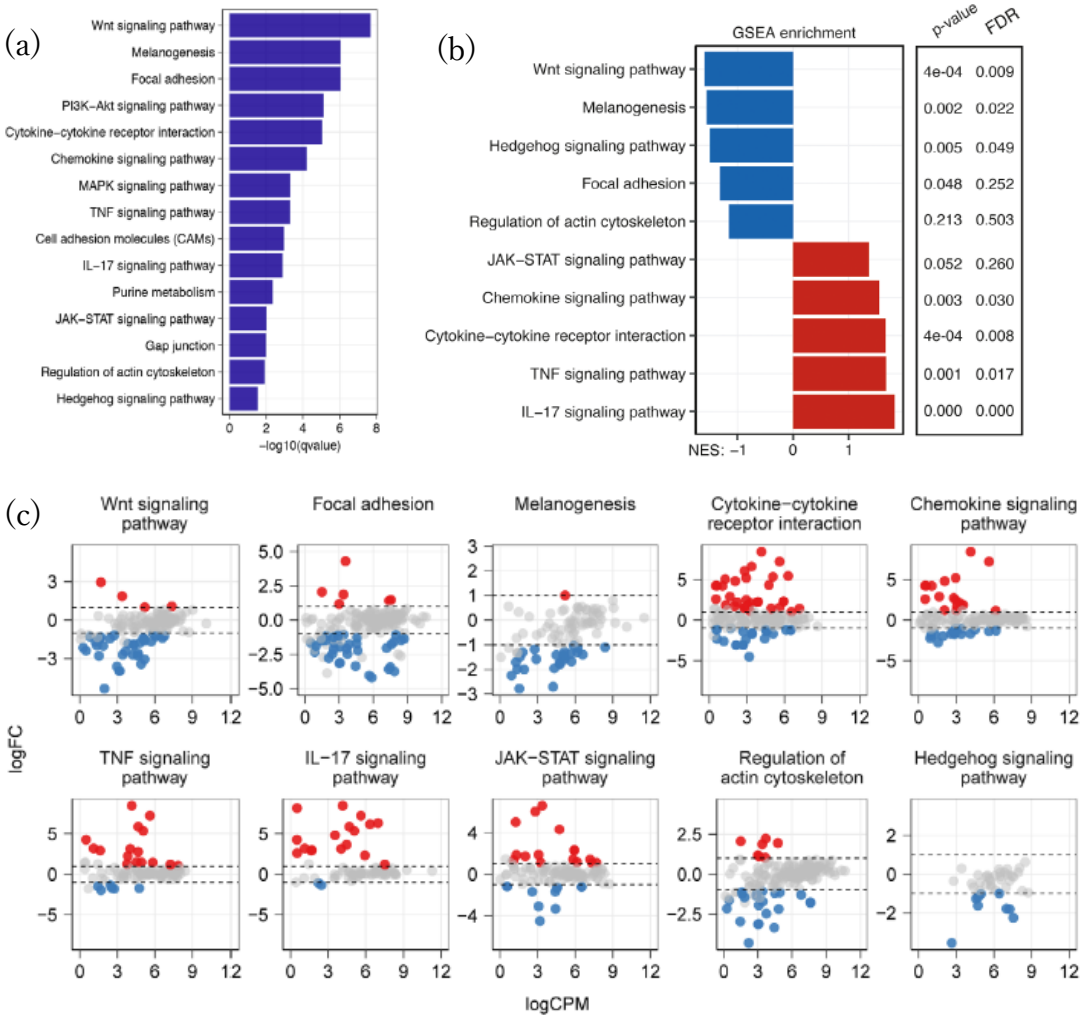


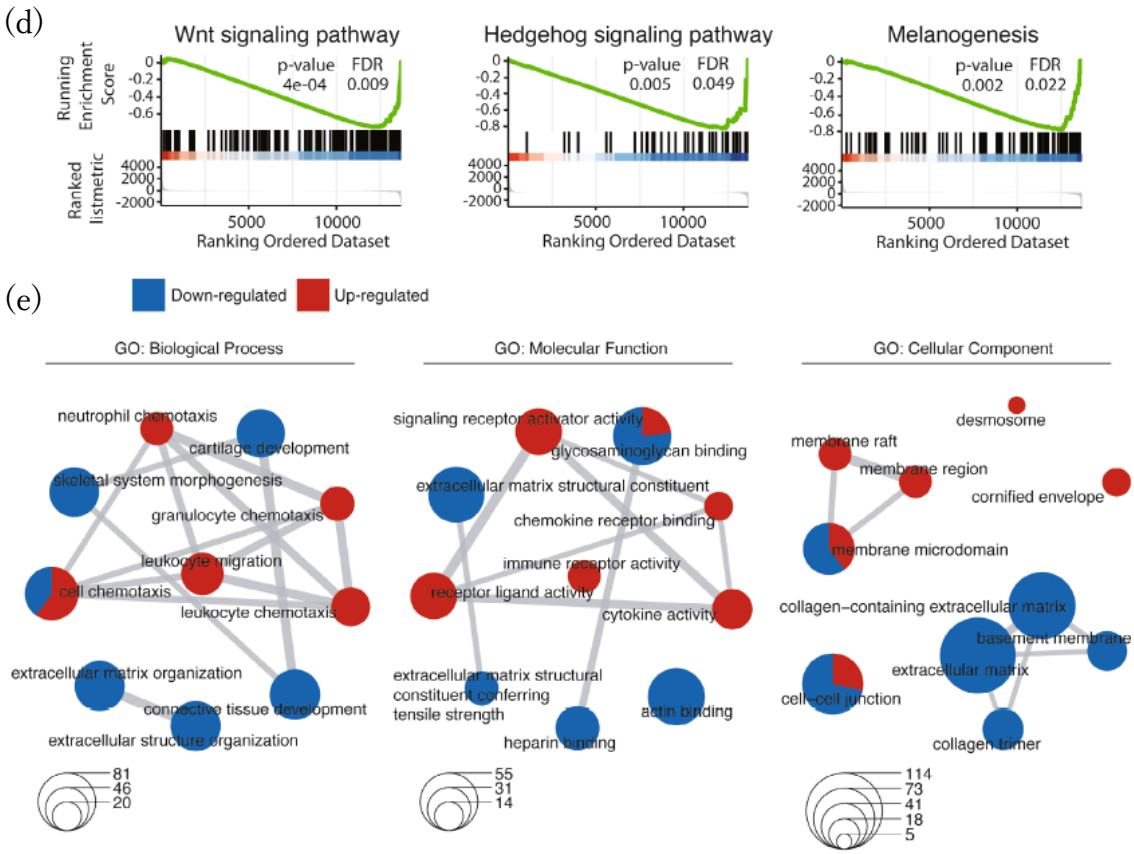
図 2B　野生型マウスの表皮下水疱の再生上皮において発現差のある遺伝子

(a) P2 の野生型マウスの水疱の再生上皮で発現差のある遺伝子群の GO 解析。

(b) 発現上昇あるいは発現低下された遺伝子群の KEGG パスウェイ/GSEA エンリッチメント解析。正規化されたエンリッチメントスコア（NES）、P 値、FDR を示す。

(c) 再生上皮で発現差のある遺伝子の散布図。赤：発現上昇した遺伝子。青：発現低下した遺伝子。

点線：| logFC |>1。



(d) Wnt シグナル伝達経路、Hedgehog シグナル伝達経路、メラニン形成の KEGG 遺伝子パスウェイ/GSEA エンリッチメント解析。

(e) それぞれの GO カテゴリ（生物学的プロセス、分子機能、細胞成分）における上位 10 個の発現上昇/低下された（FDR <0.05）GO タームクラスターのネットワーク視覚化。ノードサイズは、各 GO タームのエンリッチメントされた遺伝子の数を表す（下のパネルは遺伝子数）。ノードは、それぞれの GO タームで発現低下（青）および発現上昇（赤）した遺伝子の割合を円グラフで示す。線分の太さは GO ターム間で共有される遺伝子の数を反映している。

毛包は個体が子宮内での胎児期のみならず、出生後にも発生段階にある（図2C）（Paus et al., 1999; Saxena et al., 2019）。マウスの皮膚では、毛包の発生は 9 つの段階に分類される（毛包の下方成長を伴わない表皮角化細胞の核の凝集（ステージ 0）、毛包が下方に成長して近位部が真皮内に存在する（ステージ 1-5）、毛包近位部が皮下組織内に存在（ステージ 6-8））（Paus et al., 1999）。毛包の発生に関わる遺伝子が発現低下した（図 2B）という結果から、我々は表皮の損傷が組織の発生を調整して水疱の治癒を促進するという仮説を立てた。

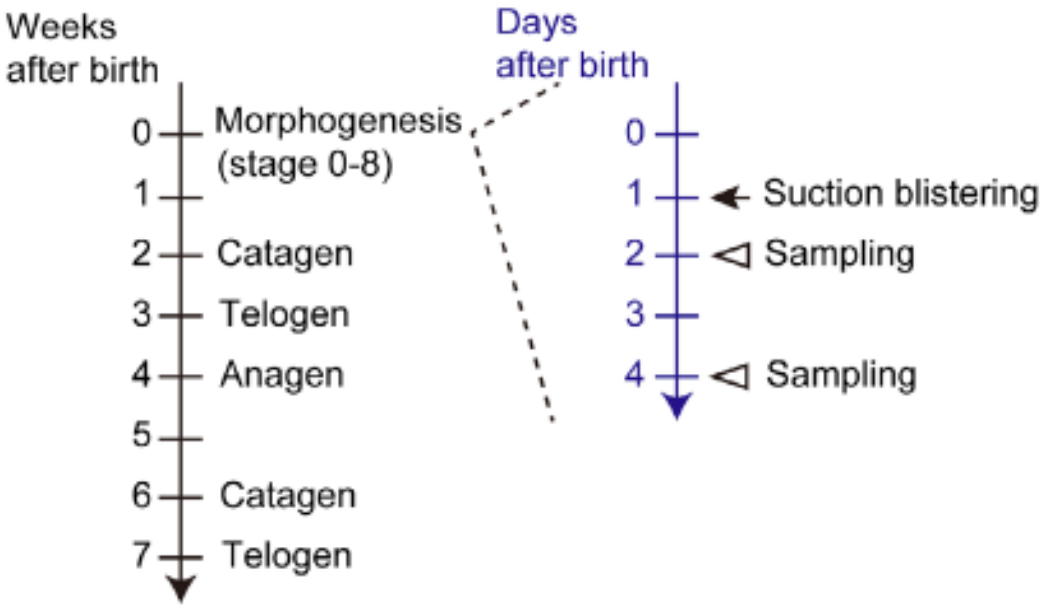


図 2C サクションブリスター実験と毛包の発生および毛周期の概略図

毛包は出生後に発生段階（Morphogenesis）にあり、その後、退行期（Catagen）、休止期（Telogen）、成長期（Anagen）のサイクルを繰り返す。本研究では、発生段階の毛包を有する皮膚で水疱作成、検体採取を行った。

この仮説と一致して、発生後期（ステージ 6-8）でのみ観察される（Paus et al., 1999）毛孔（表皮と内毛根鞘遠位部の管状の接続部）の数は、病変部で減少していた（図 2D(a)-(e)）。P4 の再生上皮の毛包は、ステージ 5（内毛根鞘が毛包の中間に位置、図 2D(b)）またはステージ 6（毛幹の先端が毛孔に到達していない段階、図 2D(c)）に分類され、成長が遅延していた。一方、水疱周囲の非病変部皮膚または同腹仔対照の正常皮膚は、ステージ 7（毛幹の先端が内毛根鞘を離れて毛孔に入る段階、図 2D(d)）の毛包を有していた（図 2D(f)）。病変部の毛包の大きさは周囲の非病変部皮膚と比較して小さく、Wnt レポーターマウス（ins-Topgal+）の LacZ 陽性領域によって示される Wnt シグナルの減弱が見られた（P2、図 2D(g)）。

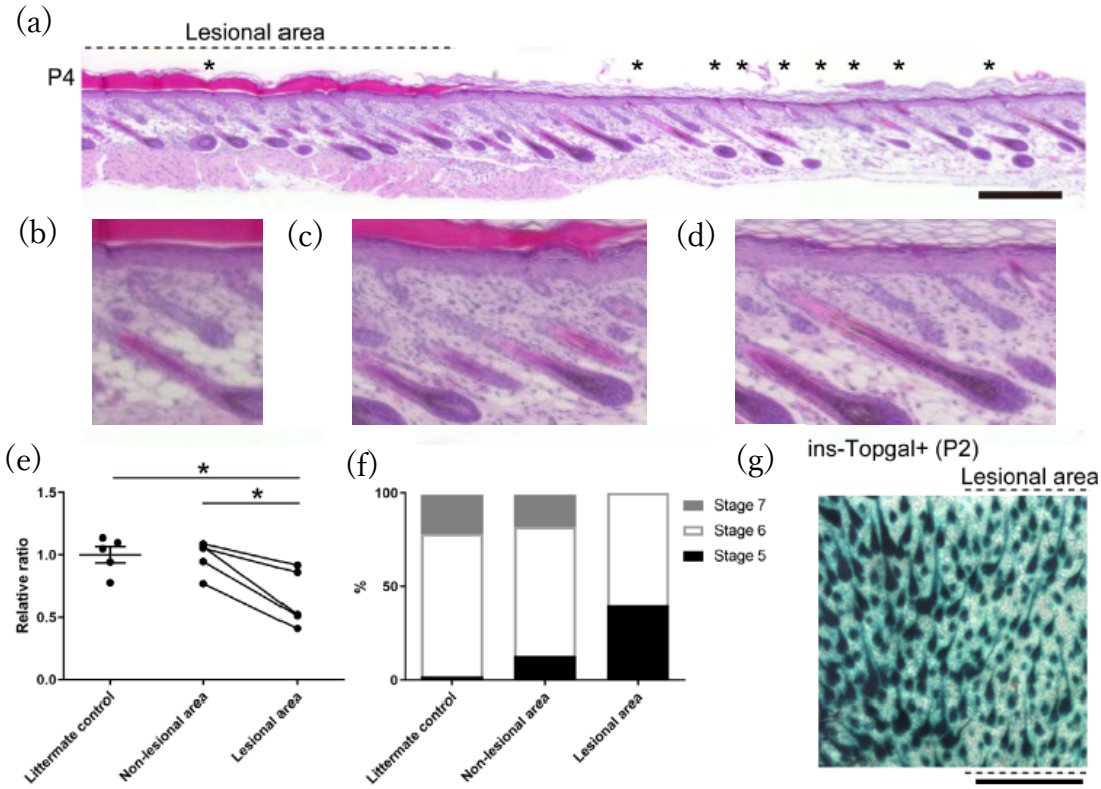


図 2D　野生型マウスの水疱における毛包発生段階

(a) P4 の野生型マウスの水疱の H&E 染色。アスタリスク：毛孔。Scale bar: 300μm。
(b) ステージ 5 の毛包。(c)ステージ 6 の毛包。(d) ステージ 7 の毛包。((a)の拡大像)。
(e) P4 の野生型マウスの病変部（Lesional area）、非病変部（Non-lesional area）、同腹仔対照マウス皮膚（Littermate control）の毛孔数の定量化（n=5）。データは平均±標準誤差あるいは個々のマウスを示す線で接続している。＊0.01 <P <0.05、一元配置分散分析後に Tukey の検定を行った。
(f) P4 の病変部、非病変部、同腹仔対照マウス皮膚における毛包発生段階（n=5）。
(g) P2 の ins-Topgal+マウスの水疱部皮膚のホールマウント画像。Wnt シグナル活性が LacZ 陽性の青色で示される。

興味深いことに、サイトカイン-サイトカイン受容体相互作用およびケモカイン、TNF、IL-17、および JAK-STAT シグナル伝達経路に関与する遺伝子の発現も、再生上皮で増強していた（図 2B(a)-(c)）。これらの経路は、免疫細胞の刺激・遊走に関わる。しかし、水疱形成の 1 日後の 1～2 層の再生上皮に覆われた病変部真皮では、好中球、リンパ球、マクロファージの数は増加していなかった。(P2、図 2E(a)-(c))。上皮化が完了した P4 においてもこれらの免疫細胞の明らかな増加はなかった（図 2E(a)-(c)）。これらの結果は、免疫細胞の水疱治癒に与える影響が少ないことを示唆する。しかし、免疫細胞またはそれらが分泌する分子（毛包新生を誘導するγδT 細胞由来の Fgf9 など（Gay et al., 2013)）の関与を完全に除外することはできず、これらが毛包の成長に影響を与える交絡因子として作用する可能性は残る。

これらのデータは、皮膚の発生時期において、表皮下水疱が毛包の成長を犠牲にして治癒することを示唆している。

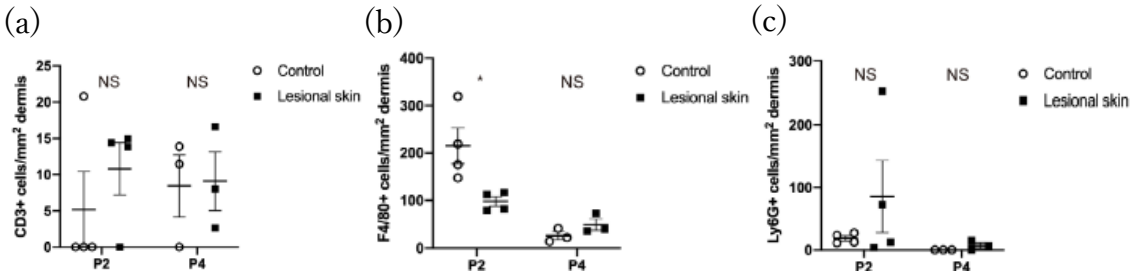


図 2E 野生型マウスの水疱に浸潤する免疫細胞

P2（n=4）および P4（n=3）の野生型マウスの水疱部および同腹仔対照マウス皮膚の真皮における免疫細胞（(a)CD3、(b)F4-80、(c)Ly6G）の定量化

（n=3)。データは平均±SE として示す。* 0.01 <P <0.05、スチューデント t 検定。NS：有意差なし。

3.　接合部毛包幹細胞の系譜細胞が水疱治癒に主に寄与する

創傷が皮膚の完全性を回復するためには上皮細胞の増殖と遊走を必要とする。そこで我々は、水疱治癒における表皮および毛包の角化細胞の動態を調べた。水疱形成の1日後（P2)、BrdU陽性細胞は毛包および水疱に隣接する非病変部表皮に豊富に存在していた(図3A(a)(b))。角化細胞の遊走のマーカーであるα5インテグリン(ITGA5)陽性の細胞（Aragona et al., 2017）は、病変部の毛包と、病変部と非病変部の境界部（表皮舌）に見られた（ 図3A(c))。再生上皮では毛包の成長が遅延し（図2D)、病変部の毛包では増殖細胞が豊富であったため（図 3A(a)(b))、毛包角化細胞は毛包の発生よりも表皮の再生に関与すると推測した。

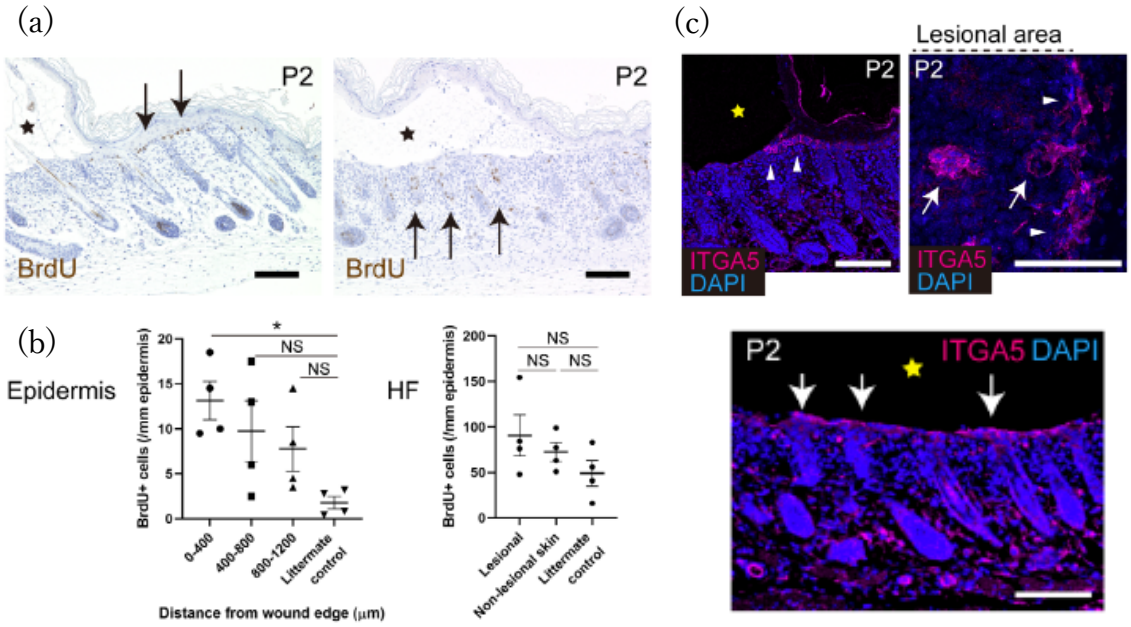


図3A　表皮下水疱における角化細胞の増殖と遊走

(a) P2の野生型マウスの水疱部のBrdU標識。矢印：BrdU陽性細胞。星：水疱。Scale bar: 100μm。

(b) P2の野生型マウスの水疱部の表皮（(a)左）と毛包（(a)右）のBrdU陽性細胞の定量化（n=4)。データは平均±SEとして示す。*0.01<P<0.05、一元配置分散分析後にTukeyの検定を行った。NS：有意差なし。

(c) P2の野生型マウスの水疱部のITGA5染色（左上：切片の水疱辺縁、右上：ホールマウントの水疱辺縁、下：切片の水疱中央)。矢頭：水疱辺縁の再生上皮（表皮舌)。矢印：毛包からの再生上皮。星：水疱。Scale bar: 100μm。

この仮説を確かめるため、サクションブリスターモデルにおいて短期間の系統追跡法を用いた（図 3B(a)）。K14 系統追跡細胞（K14CreER:R26R-H2B-mCherry または K14CreER:R26R-confetti）は、主に毛包間表皮幹細胞の系譜細胞であるが、再生上皮において少数のみ観察された（図 3B(b)(c)）。

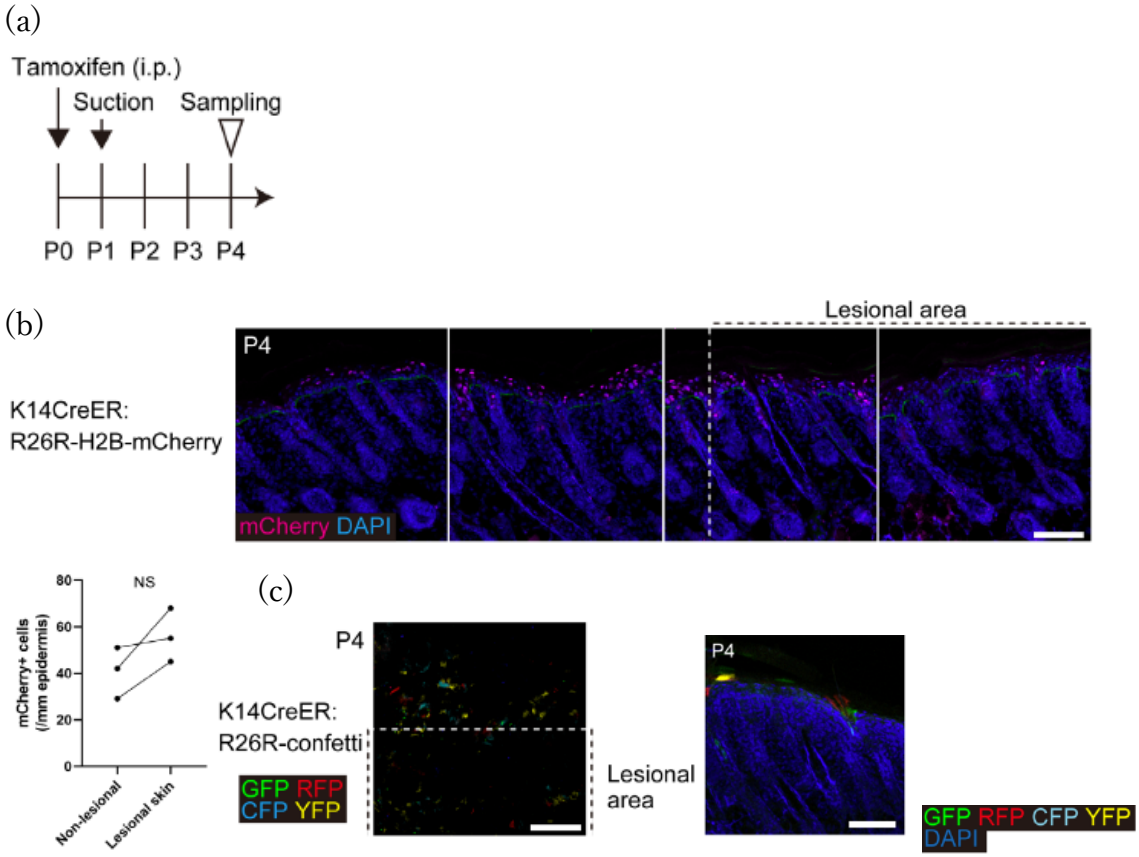


図 3B　系統追跡法の概略と毛包間表皮幹細胞の水疱治癒への寄与

(a) 系統追跡法の概略図。

(b) （上）P4 の K14CreER:H2B-mCherry マウスの切片。Scale bar: 100μm。（下）mCherry 陽性細胞の定量化（n=3）。個々のマウスのデータを線で接続している。スチューデントの t 検定。NS：有意差なし。

(c) （左）P4 の K14CreER:R26R-confetti マウスの水疱のホールマウント画像。Scale bar: 200μm。（右）P4 の K14CreER:R26R-confetti マウス皮膚の水疱部。 Scale bar: 100μm。

対照的に、再生上皮の細胞の多くは、接合部毛包幹細胞の系譜細胞である Lrig1（Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1）系統追跡細胞（Lrig1CreER:R26R-H2B-mCherry または Lrig1CreER:R26R-confetti）であった（図 3C(a)(b)）。

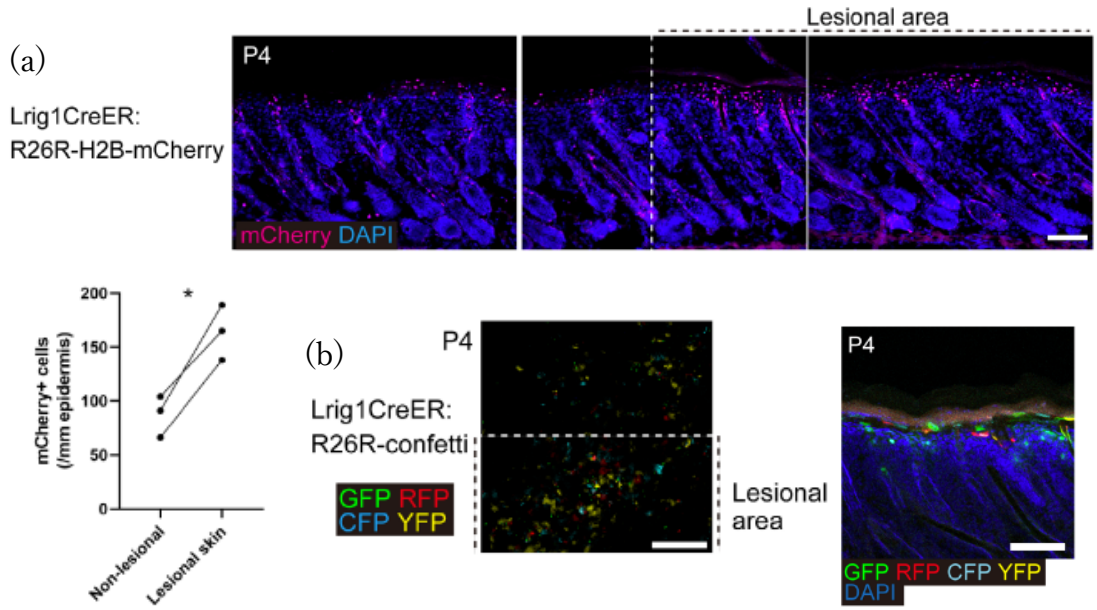


図 3C　接合部毛包幹細胞の水疱治癒への寄与

(a)　（上）P4 の Lrig1CreER:H2B-mCherry マウスの切片。Scale bar: 100μm。（下）mCherry 陽性細胞の定量化（n=3）。個々のマウスのデータを線で接続している。* 0.01<P<0.05、スチューデントの t 検定。NS：有意差なし。

(b)（左）P4 の Lrig1CreER:R26R-confetti マウスの水疱のホールマウント画像。Scale bar: 200μm。（右）P4 の Lrig1CreER:R26R-confetti マウス皮膚の水疱部。Scale bar: 100μm。

これらの結果と一致して、増殖マーカーであるリン酸化ヒストン H3（phospho-Histone H3; PH3）陽性細胞が、P2 の Lrig1 系統追跡細胞で観察された（図 3D(a)(b)）。再生上皮における K14 および Lrig1 系統追跡細胞は P1（水疱形成時）から P4（サンプリング時）でともに増加したが、Lrig1 系統追跡細胞の増加がより顕著であった（図 3D(c)）。これに対して、P2 の再生上皮の RNA シーケンシングでは、Lrig1 遺伝子の発現はアップレギュレーションされていなかった。以上のデータから、病変部の真皮側の毛包接合部が毛包の発生を停止しながら、表皮下水疱治癒のための角化細胞を供給することを示す。なお、接合部以外の毛包部位由来の角化細胞も水疱治癒に関与する可能性は、完全に否定できない。

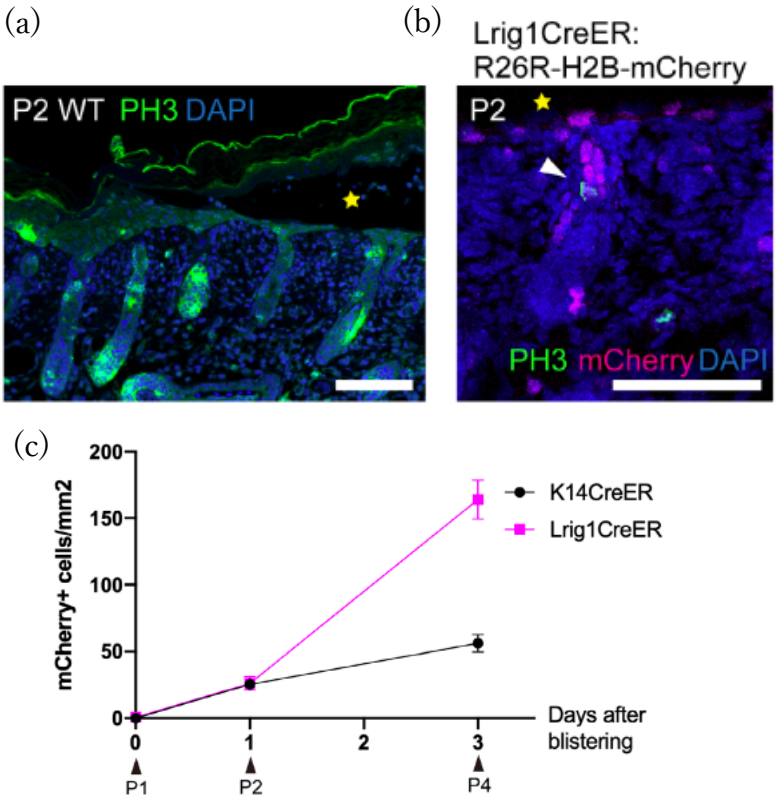


図 3D　接合部毛包幹細胞の系譜細胞の増殖

(a) P2 の野生型マウスの水疱部皮膚の PH3 染色。星：水疱。Scale bar: 100μm。

(b) P2 の Lrig1CreER:R26R-H2B-mCherry マウスの水疱部の PH3 染色（矢頭）。Scale bar: 100μm。

(c) 系統追跡法における mCherry 陽性細胞の定量化（n=3）。データは平均±SE として示す。

4. 水疱底の毛包の減少は毛包間表皮幹細胞の系譜細胞の水疱治癒への寄与を促進する

水疱治癒に接合部毛包幹細胞の系譜細胞が寄与するという結果から、水疱底に毛包がない場合に表皮がどのように再生するかを調べることにした。17 型コラーゲン（type XVII collagen; COL17）は、毛包間表皮だけでなく毛包のバルジ領域にも発現している（図 4A(a)）（Liu et al., 2019; Matsumura et al., 2016; Natsuga et al., 2019; Tanimura et al., 2011; Watanabe et al., 2017）。COL17 は *COL17A1* 遺伝子によってコードされており、その欠損は接合部型表皮水疱症を引き起こす（McGrath et al., 1995）。サクションブリスター法によって *Col17a1*$^{-/-}$マウス（Nishie et al., 2007）の新生仔背部皮膚に水疱を作成すると、野生型新生仔マウス（図 1C(a)(b)）の場合と同様に、ITGA6 と COL4/L332 の間で裂隙が観察された（図 4A(b)(c)）。

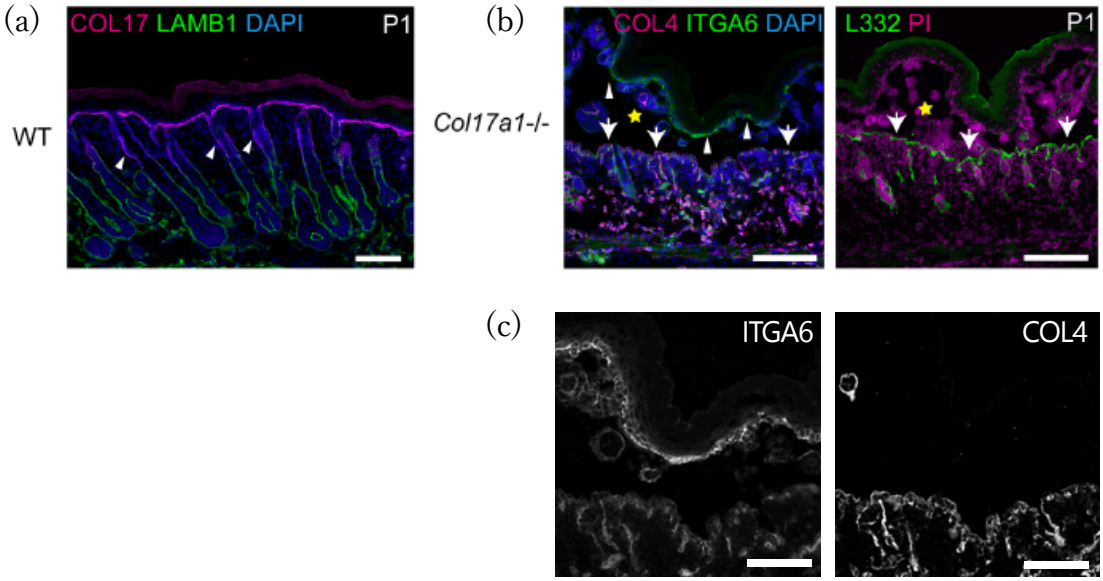


図 4A　*Col17a1*$^{-/-}$マウスの水疱の裂隙形成のレベル

(a) P1 の野生型マウスの背部皮膚の COL17（マゼンタ）およびラミニンβ1（LAMB1、緑）染色。矢頭：バルジ領域。Scale bar: 100μm。

(b) P1 の *Col17a1*$^{-/-}$マウス背部皮膚の水疱部の（左）ITGA6（矢印）および COL4(矢頭)染色、（右）L332 染色(矢印)。星：水疱。Scale bar: 100μm。

(c) (b)左の拡大像。左：ITGA6。右：COL4。Scale bar: 200μm。

興味深いことに、*Col17a1*$^{-/-}$マウスの水疱部では、ほとんどの毛包が真皮から剥離した（P1、図 4B(a)）。この発見と一致して、*Col17a1*$^{-/-}$マウスの水疱蓋側に毛乳頭細胞（アルカリホスファターゼ（AP）陽性）が観察されたが、対照マウスの水疱蓋にはこれらの細胞が観察されなかった（P1、図 4B(b)(c)）。

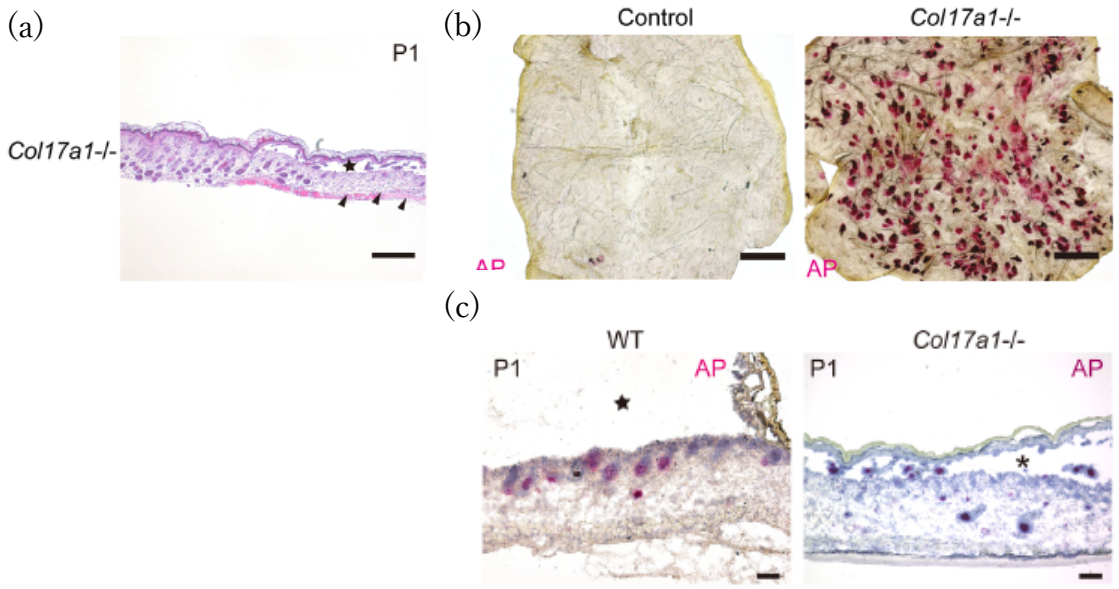


図 4B　*Col17a1*$^{-/-}$マウスの水疱形成

(a) P1 の *Col17a1*$^{-/-}$マウスの背部皮膚の表皮下水疱の H&E 染色。矢印：真皮からの毛包の剥離。Scale bar: 500μm。

(b) P1 の *Col17a1*$^{-/-}$マウス（右）および同腹仔対照マウス（左）の水疱蓋表皮のホールマウント AP 染色。Scale bar: 500μm。

(c) P1 の *Col17a1*$^{-/-}$マウス（右）および野生型マウス（左）の水疱部の切片の AP 染色。Scale bar: 100μm。

水疱形成 1 日後の *Col17a1*$^{-/-}$マウスでは再生上皮は見られなかったが、対照マウスではα6 インテグリン (ITGA6) の発現を伴う上皮の再生が見られた (P2、図 4C(a)(b)、表 2)。*Col17a1*$^{-/-}$マウスは、水疱形成の 3 日後に再生上皮でのロリクリン（LOR）の発現が遅れていた（P4、図 4C(c)、表 2)。

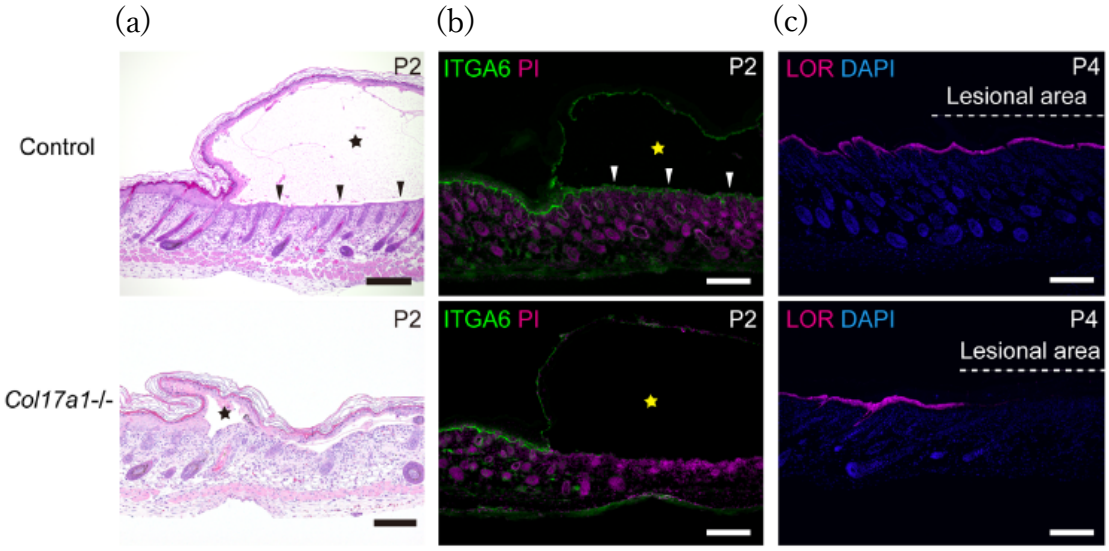


図 4C *Col17a1*$^{-/-}$マウスの水疱の再生上皮

(a) P2 の *Col17a1*$^{-/-}$マウス（下）および同腹仔対照マウス（上）の水疱の H&E 染色。矢頭：再生上皮。星：水疱。Scale bar: 200μm。

(b) P2 の *Col17a1*$^{-/-}$マウス (下) および同腹仔対照マウス (上) の水疱の ITGA6 染色。矢頭：再生上皮。星：水疱。Scale bar: 200μm。

(c) P4 の *Col17a1*$^{-/-}$マウス（下）および同腹仔対照マウス（上）の水疱の LOR 染色。Scale bar: 200μm。

	Timepoint	PCK	K14	K10	LOR	ITGA6	COL4	L332
WT	P1	- (n=4)	- (n=4)	- (n=4)	- (n=4)	- (n=3)	++ (n=3)	++ (n=3)
	P2	+ (n=3)	+ (n=3)	- (n=3)	- (n=3)	++ (n=4)	++ (n=4)	++ (n=4)
	P4 (n=3)	++	++	++	++	++	++	++
Col17a1-/-	P1	- (n=4)	- (n=4)	- (n=4)	- (n=4)	- (n=3)	++ (n=3)	++ (n=3)
	P2 (n=3)	-	-	-	-	-	++	++
	P4 (n=3)	-	-	-	-	-	++	++

表 2　野生型（WT）マウス（表 1）と *Col17a1*$^{-/-}$マウスの水疱における蛍光免疫染色の結果のまとめ

PCK：パンサイトケラチン、K14：ケラチン 14、K10：ケラチン 10、LOR：ロリクリン、ITGA6：α6 インテグリン、COL4：4 型コラーゲン、L332：ラミニン 332

毛包が創床から減少した際に、どこから角化細胞が供給されるかを調べるためにBrdU アッセイと系統追跡実験を行った。P 2 の *Col17a1*$^{-/-}$マウスの水疱における BrdU 陽性細胞は、対照群の場合と同様に水疱に隣接する表皮に豊富に存在していた（図3A(a)(b)、4D(a)）。系統追跡実験（K14CreER:R26R-H2B-mCherry:*Col17a1*$^{-/-}$マウス）では、毛包間表皮幹細胞の系譜細胞が P4 の再生上皮の大部分に存在していた（図4D(b)(c)）。

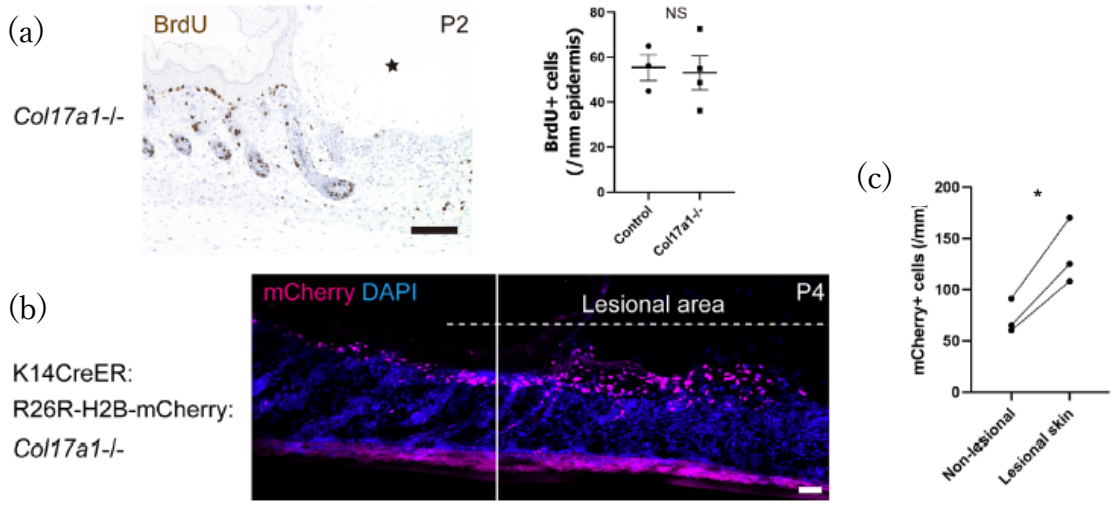


図 4D *Col17a1*$^{-/-}$マウスの水疱における角化細胞の増殖と毛包間表皮幹細胞の治癒への寄与

(a)（左）P2 の *Col17a1*$^{-/-}$マウスの水疱の BrdU 標識。Scale bar: 100μm。（右)水疱辺縁の表皮における BrdU 陽性細胞の定量化（n=3（対照マウス)、n=4（*Col17a1*$^{-/-}$マウス））。データは平均±SE として示す。スチューデントの t 検定。NS：有意差なし。

(b) P4 の K14CreER:R26R-H2B-mCherry:*Col17a1*$^{-/-}$マウスの系統追跡実験。Scale bar: 100μm。

(c) (b)の再生上皮における mCherry 陽性細胞の定量化（n=3)。個々のマウスのデータは線で接続している。*0.01<P<0.05、スチューデントの t 検定。

ヒト COL17 を過剰発現させることによる *Col17a1*$^{-/-}$マウスのトランスジェニックレスキュー（hCOL17+;*Col17a1*$^{-/-}$マウス）（Nishie et al., 2007）では、水疱形成の 3 日後に軽度のロリクリン（LOR）の再生を伴う上皮化が見られ、水疱治癒が改善した（P4、図 4E、表 3）。以上のデータから、ほとんどの毛包が真皮から剥離する状態では、毛包間表皮由来の角化細胞が接合部毛包幹細胞の欠如を補って創傷を修復することが示された。

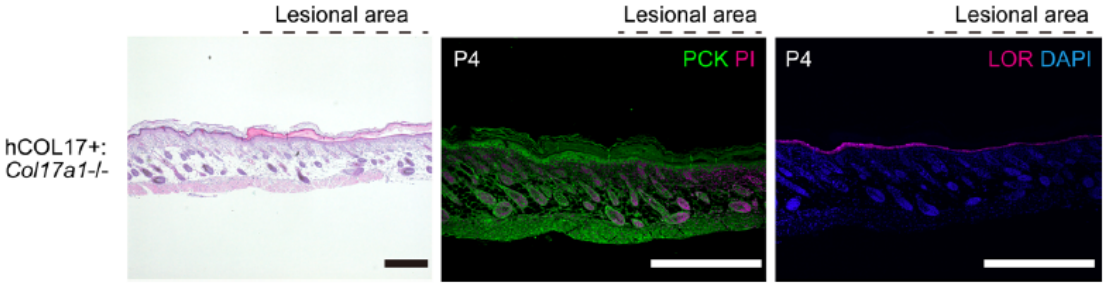


図 4E　hCOL17+;*Col17a1*$^{-/-}$マウスの水疱の治癒

P4 の *Col17a1*$^{-/-}$マウスのヒト COL17 過剰発現によるトランスジェニックレスキュー（hCOL17+;*Col17a1*$^{-/-}$マウス）の水疱の H&E（左）、PCK（中）、LOR 染色（右）（n=4）。Scale bar: 500μm。

	Timepoint	PCK	K14	K10	LOR	ITGA6	COL4	L332
WT	P1	- (n=4)	- (n=4)	- (n=4)	- (n=4)	- (n=3)	++ (n=3)	++ (n=3)
	P2	+ (n=3)	+ (n=3)	- (n=3)	- (n=3)	++ (n=4)	++ (n=4)	++ (n=4)
	P4 (n=3)	++	++	++	++	++	++	++
Col17a1-/-	P1	- (n=4)	- (n=4)	- (n=4)	- (n=4)	- (n=3)	++ (n=3)	++ (n=3)
	P2 (n=3)	-	-	-	-	-	++	++
	P4 (n=3)	-	-	-	-	-	++	++
hCOL17+; *Col17a1-/-*	P1	- (n=4)	- (n=4)	- (n=4)	- (n=4)	- (n=3)	++ (n=3)	++ (n=3)
	P2 (n=3)	- ~ +	- ~ +	-	-	- ~ +	++	++
	P4 (n=3)	++	++	+	+	++	++	++

表 3　野生型（WT）マウス（表 1）、*Col17a1*$^{-/-}$マウス（表 2）、hCOL17+;*Col17a1*$^{-/-}$マウスの水疱における蛍光免疫染色の結果のまとめ

PCK：パンサイトケラチン、K14：ケラチン 14、K10：ケラチン 10、LOR：ロリクリン、ITGA6：α6 インテグリン、COL4：4 型コラーゲン、L332：ラミニン 332

5. 再生上皮角化細胞の平坦化障害は水疱治癒の遅延につながる

(1) *Col7a1*$^{-/-}$マウスの水疱治癒過程

我々はさらに、表皮下水疱の治癒を調節する因子を特定しようと考えた。初めに、*COL7A1* によってコードされる 7 型コラーゲン（type VII collagen; COL7）に注目した。COL7 は係留線維を形成し、表皮真皮接合部（図 5A(a)）では基底膜の直下に位置する（Shimizu et al., 1997; Watanabe et al., 2018）。COL7 の欠損は栄養障害型表皮水疱症を引き起こす（Christiano et al., 1993; Hilal et al., 1993）。従来の全層皮膚損傷による創傷治癒実験では、COL7 低形成マウスで創傷治癒が遅延すると報告されている（Nystrom et al., 2013）。そこで我々は、*Col7a1*$^{-/-}$マウス（Heinonen et al., 1999）にサクションブリスター法を応用して表皮下水疱の治癒過程を観察した。野生型および *Col17a1*$^{-/-}$マウスの水疱（図 1C(a)-(d)、4A(b)(c)）とは対照的に、*Col7a1*$^{-/-}$マウス背部皮膚では水疱蓋に COL4 と L332 が存在し、皮膚の裂隙は基底膜下のレベルで生じていた（P1、図 5A(b)-(e)）。

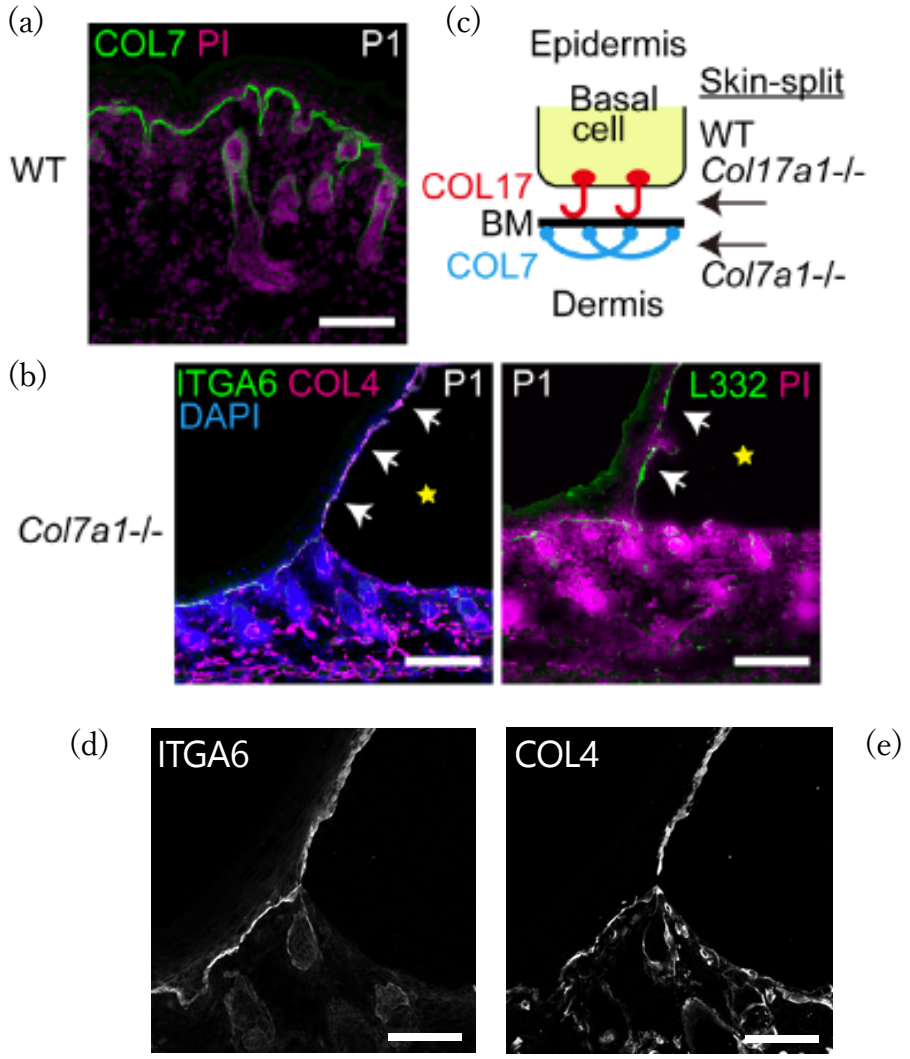


図 5A　*Col7a1*$^{-/-}$マウスの水疱の裂隙形成のレベル

(a) P1 の野生型マウス背部皮膚切片の COL7 染色。Scale bar: 200μm。

(b) P1 の *Col7a1*$^{-/-}$マウスの水疱の ITGA6/COL4（左、矢印)および L332（右、矢印）染色。Scale bar: 100μm。

(c) 野生型マウス、*Col17a1*$^{-/-}$マウス、*Col7a1*$^{-/-}$マウスの皮膚裂隙の模式図。 BM：基底膜。

(d) (b)左の ITGA6 の拡大像。Scale bar: 200μm。

(e) (b)左の COL4 の拡大像。Scale bar: 200μm。

Col7a1$^{-/-}$マウスでは水疱形成の 1 日後に表皮欠損は修復されなかったが、対照群の病変部では再生上皮が見られ（P2、図 5B(a)(b)、表 4)、これは COL7 低形成マウスの全層皮膚欠損モデルの治癒遅延の結果と一致していた（Nystrom et al., 2013)。この結果は、COL7 欠損角化細胞が培養条件において正常角化細胞よりも速く遊走するという事実とは対照的であった（Chen et al., 2002; Chen et al., 2000)。

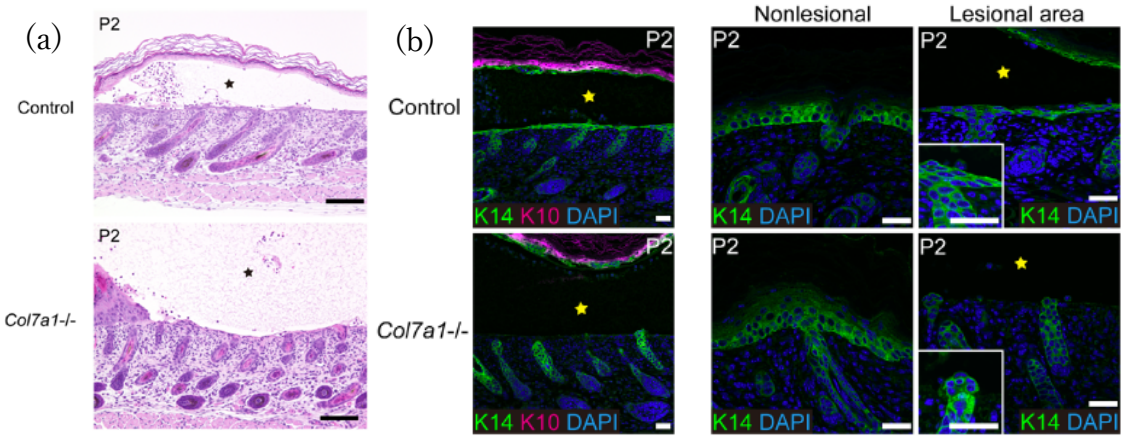


図 5B　*Col7a1*$^{-/-}$マウスの水疱の裂隙形成のレベル

(a) P2 の *Col7a1*$^{-/-}$マウス（下）および同腹仔対照マウス（上）の水疱の H&E 染色（それぞれ n=4、n=3)。星：水疱。Scale bar: 100μm。

(b) P2 の *Col7a1*$^{-/-}$マウス（下）および同腹仔対照マウスの水疱の、K10/K14 (病変部の弱拡大像、左)および K14 (強拡大像、非病変部（中）および病変部（右）)染色。星：水疱。Scale bar: 30μm。

	Timepoint	PCK	K14	K10	LOR	ITGA6	COL4	L332
WT	P1	- (n=4)	- (n=4)	- (n=4)	- (n=4)	- (n=3)	++ (n=3)	++ (n=3)
	P2	+ (n=3)	+ (n=3)	- (n=3)	- (n=3)	++ (n=4)	++ (n=4)	++ (n=4)
	P4 (n=3)	++	++	++	++	++	++	++
Col17a1-/-	P1	- (n=4)	- (n=4)	- (n=4)	- (n=4)	- (n=3)	++ (n=3)	++ (n=3)
	P2 (n=3)	-	-	-	-	-	++	++
	P4 (n=3)	-	-	-	-	-	++	++
hCOL17+; *Col17a1-/-*	P1	- (n=4)	- (n=4)	- (n=4)	- (n=4)	- (n=3)	++ (n=3)	++ (n=3)
	P2 (n=3)	- ~ +	- ~ +	-	-	- ~ +	++	++
	P4 (n=3)	++	++	+	+	++	++	++
Col7a1-/-	P1 (n=3)	-	-	-	-	-	-	-
	P2 (n=3)	-	-	-	-	-	-	-
	P4 (n=3)	++	++	+	+	++	++	++

表 4　野生型（WT）マウス（表 1）、*Col17a1*$^{-/-}$マウス（表 2）、hCOL17+;*Col17a1*$^{-/-}$マウス（表 3）、*Col7a1*$^{-/-}$マウスの水疱における蛍光免疫染色の結果のまとめ

PCK：パンサイトケラチン、K14：ケラチン 14、K10：ケラチン 10、LOR：ロリクリン、ITGA6：α6 インテグリン、COL4：4 型コラーゲン、L332：ラミニン 332

毛包が水疱の治癒に大きく寄与するというこれまでの結果（図 3A-D）から、*Col7a1*$^{-/-}$マウスの創傷治癒遅延を説明するためにまず毛包に着目した。しかし、*Col17a1*$^{-/-}$マウスとは対照的に、*Col7a1*$^{-/-}$マウスの水疱底には毛包が存在していた（P1、図 5C(a)）。さらに、毛包の BrdU 陽性細胞の数は *Col7a1*$^{-/-}$マウスと対照マウスで同等であり（P2、図 5C(b)(c)）、毛包角化細胞の増殖では *Col7a1*$^{-/-}$マウスの水疱治癒の遅延を説明できないことが示唆された。

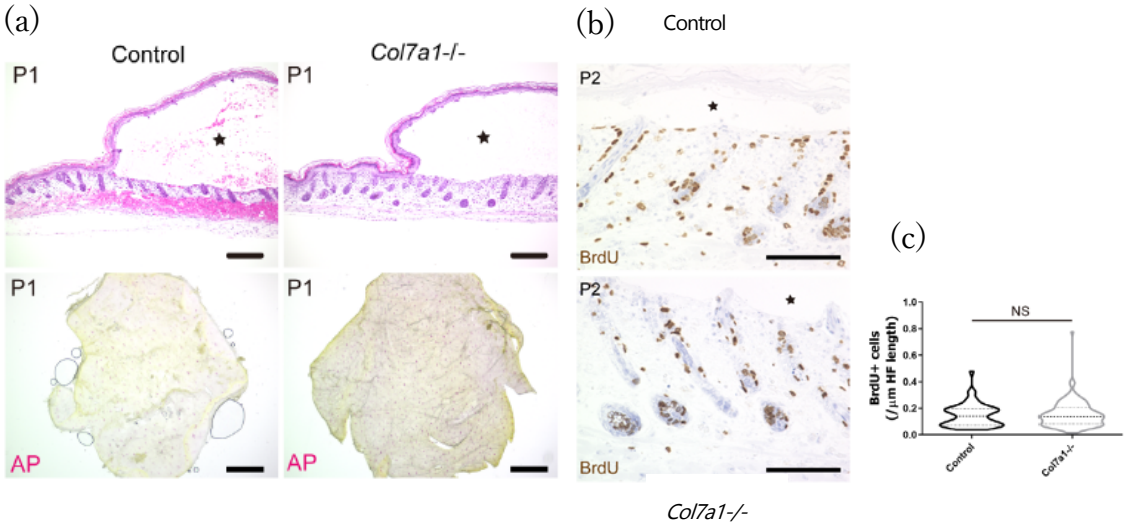


図 5C　*Col7a1*$^{-/-}$マウスの水疱部の毛包の増殖能

(a)　（上）P1 の *Col7a1*$^{-/-}$マウス（右）および同腹仔対照マウス（左）の水疱の H&E 染色。星：水疱。Scale bar: 200μm。（下）P1 の *Col7a1*$^{-/-}$マウス(右）およびその同腹子コントロール（左）の水疱蓋表皮のホールマウント AP 染色。Scale bar: 200μm。

(b) P2 の *Col7a1*$^{-/-}$マウス（下）および同腹仔対照マウス（上）の水疱の BrdU 標識（それぞれ n=4、n=3)。星：水疱。Scale bar: 100μm。

(c) (b)の毛包の長さ 1μm あたりの BrdU 陽性細胞の定量化（対照マウス 3 匹から n=55 本の毛包、*Col7a1*$^{-/-}$マウス 4 匹から n=143 本の毛包)。データはバイオリンプロットとして示す。スチューデントの t 検定。NS：有意差なし。

これは、毛包角化細胞の増殖以外に水疱の治癒を調節する要因があることを強く示唆している。水疱の治癒過程で、角化細胞は楔状に形態が変化し（図 1E(a)(b)）、これは、再生上皮でアクチン細胞骨格の調節に関与する遺伝子群の発現が減少しているという RNA シーケンシングのデータにも反映されている（図 2B(a)-(c)）。楔状あるいは平坦な角化細胞は、表皮の欠損を被覆するという点で立方体あるいは円柱状の角化細胞よりも優れていると考えられる。これらのデータから、細胞の形態の変化が水疱の治癒遅延と関連している可能性を考えた。非病変部の皮膚では、*Col7a1*$^{-/-}$マウスの基底層の角化細胞の形態は、対照群の角化細胞の形態と類似していた（P2、図 5D(a)(b)の非病変部）。図 1F に示すように、再生上皮は対照群では形態が楔状あるいは平坦であったが、*Col7a1*$^{-/-}$マウスの再生上皮の角化細胞は、対照群の角化細胞ほど平坦とはならず立方体状であり（P2、図 5D(a)(b)の病変領域）、水疱治癒遅延と相関していた。

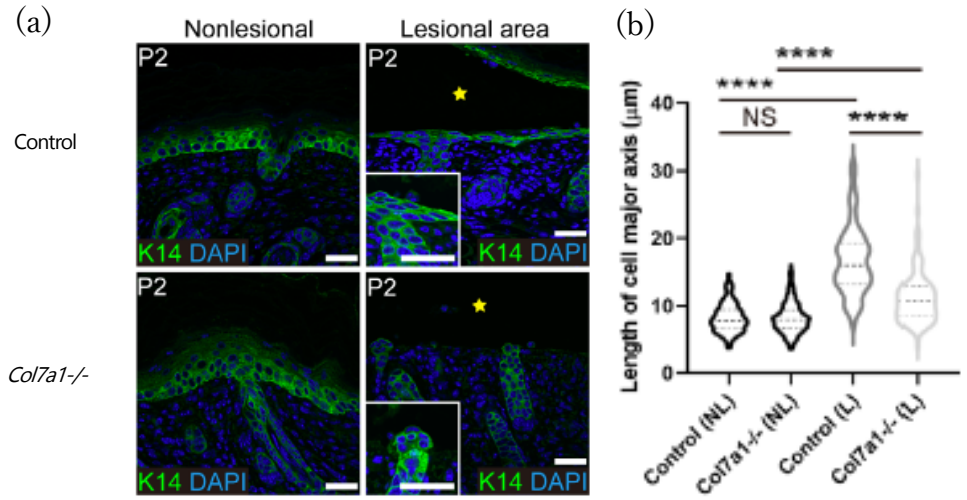


図 5D　*Col7a1*$^{-/-}$マウスの再生上皮角化細胞の形態

(a) 図 5B(b)より再掲。P2 の *Col7a1*$^{-/-}$マウス（下）および同腹仔対照マウスの水疱の K14（強拡大像、非病変部（左）および病変部（右））染色。星：水疱。Scale bar: 100μm。
(b) (a)の再生上皮角化細胞（対照マウスの病変部 244 細胞、*Col7a1*$^{-/-}$マウスの病変部 132 細胞、それぞれ 4 個体）および水疱周囲の正常表皮角化細胞(基底細胞; 対照マウスの非病変部 200 細胞、*Col7a1*$^{-/-}$マウスの非病変部 299 細胞、それぞれ 4 個体)の長軸の長さ。NL：非病変部。L：病変部。 データはバイオリンプロットで示す。****P< 0.0001、一元配置分散分析後に Tukey の検定。NS：有意差なし。

(2) $CaCl_2$投与マウスの水疱治癒過程

次に、野生型マウスの水疱内へのカルシウム投与実験を行った。細胞外カルシウムは、培養角化細胞の増殖と遊走の強力な阻害剤であり、分化の誘導因子でもある（Hennings et al., 1980; Magee et al., 1987）。従来の in vitro アッセイと一致して、水疱形成直後の $CaCl_2$（1.8mM または 9.0mM）の水疱内投与によって上皮の再生を遅延した（P2、図 5E(a)(b)、表 5）。分化の阻害が創傷治癒を妨げた可能性を考えたが、K10 で標識される分化した角化細胞は水疱蓋でのみ観察され、水疱底には存在しなかった（P2、図 5E(b)）ことから、分化は治癒遅延に関与していないと考えられた。

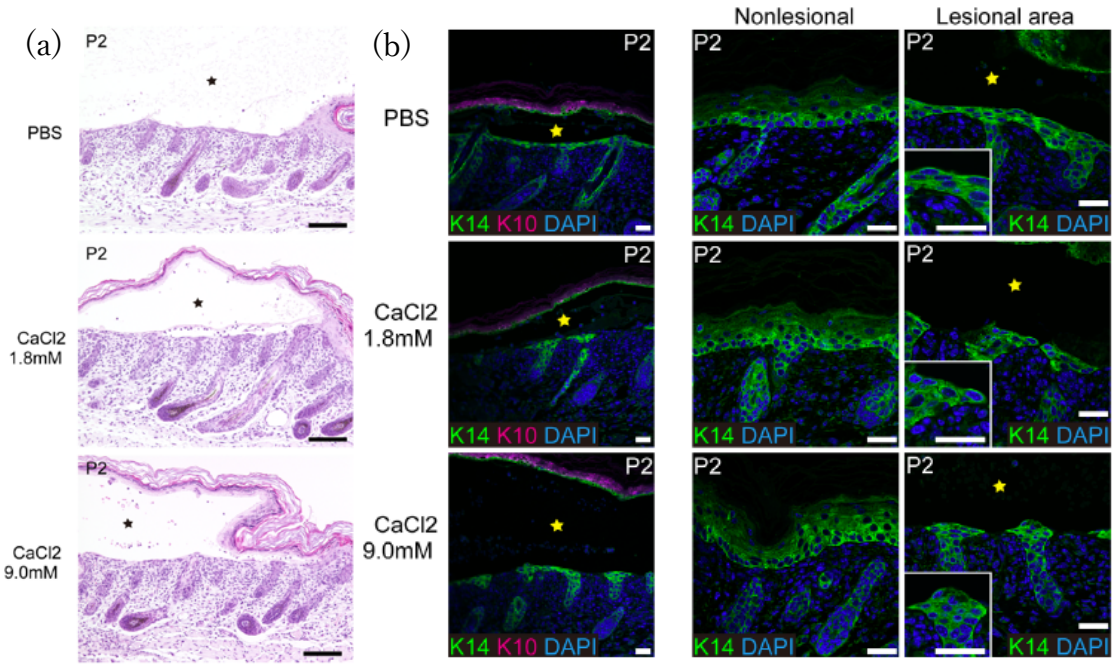


図 5E　$CaCl_2$投与マウスの再生上皮角化細胞の形態

(a) P2 の $CaCl_2$投与マウス（中、下）および PBS 投与同腹仔対照マウス（上）の水疱の H&E 染色(n=3)。星：水疱。Scale bar: 100μm。

(b) P2 の $CaCl_2$投与マウス（中、下）および PBS 投与同腹仔対照マウス（上）の水疱の、K10/K14 (病変部の弱拡大像、左)および K14 (強拡大像、非病変部（中）および病変部（右）)染色。星：水疱。Scale bar: 30μm。

	Timepoint	PCK	K14	K10	LOR	ITGA6	COL4	L332
WT	P1	- (n=4)	- (n=4)	- (n=4)	- (n=4)	- (n=3)	++ (n=3)	++ (n=3)
	P2	+ (n=3)	+ (n=3)	- (n=3)	- (n=3)	++ (n=4)	++ (n=4)	++ (n=4)
	P4 (n=3)	++	++	++	++	++	++	++
Col17a1-/-	P1	- (n=4)	- (n=4)	- (n=4)	- (n=4)	- (n=3)	++ (n=3)	++ (n=3)
	P2 (n=3)	-	-	-	-	-	++	++
	P4 (n=3)	-	-	-	-	-	++	++
hCOL17+; *Col17a1-/-*	P1	- (n=4)	- (n=4)	- (n=4)	- (n=4)	- (n=3)	++ (n=3)	++ (n=3)
	P2 (n=3)	- ~ +	- ~ +	-	-	- ~ +	++	++
	P4 (n=3)	++	++	+	+	++	++	++
Col7a1-/-	P1 (n=3)	-	-	-	-	-	-	-
	P2 (n=3)	-	-	-	-	-	-	-
	P4 (n=3)	++	++	+	+	++	++	++
Ca-treated (1.8 mM)	P2 (n=4)	- ~ +	- ~ +	-	-	- ~ +	++	++
	P4 (n=3)	++	++	++	+ ~ ++	++	++	++
Ca-treated (9.0 mM)	P2 (n=4)	- ~ +	- ~ +	-	-	- ~ +	++	++
	P4 (n=3)	++	++	++	+ ~ ++	++	++	++

表５　野生型（WT）マウス（表１)、*Col17a1*$^{-/-}$マウス（表２)、hCOL17+;*Col17a1*$^{-/-}$マウス（表３)、*Col7a1*$^{-/-}$マウス（表４)、$CaCl_2$投与マウスの水疱における蛍光免疫染色の結果のまとめ

PCK：パンサイトケラチン、K14：ケラチン 14、K10：ケラチン 10、LOR：ロリクリン、ITGA6：α6 インテグリン、COL4：4 型コラーゲン、L332：ラミニン 332

Col7a1$^{-/-}$マウスの水疱と同様に、毛包の BrdU 陽性細胞の数は、$CaCl_2$ 投与マウスの水疱では減少しなかった（P2、図 5F(a)(b)）。

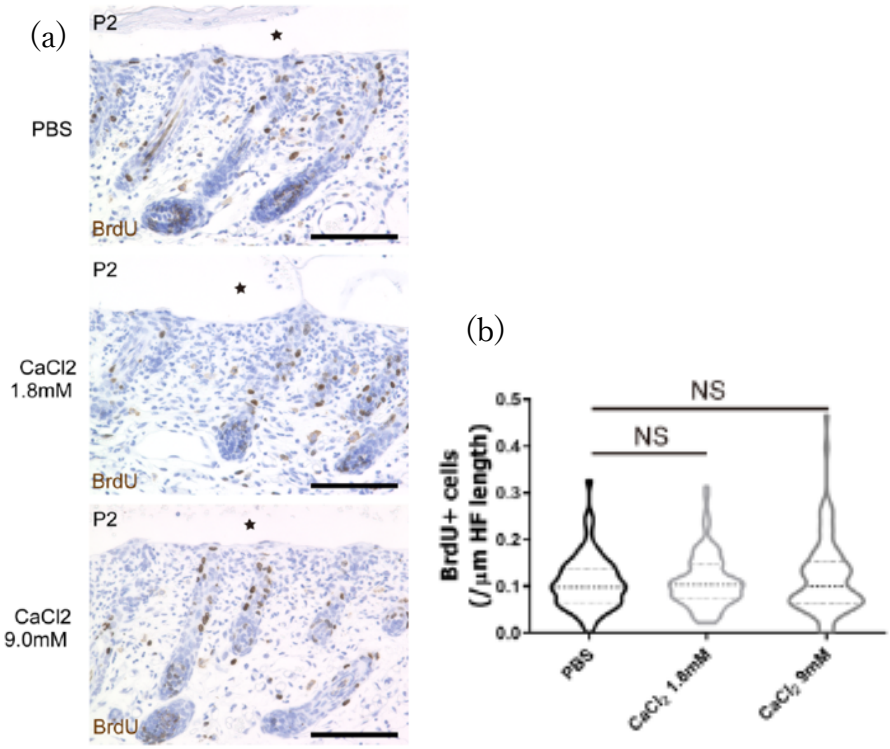


図 5F　*Col7a1*$^{-/-}$マウスの水疱部の毛包の増殖能

(a) P2 の $CaCl_2$ 投与マウス（中、下）および PBS 投与同腹仔対照マウス（上）の水疱の BrdU 標識(n=3)。星：水疱。Scale bar: 100μm。

(b) (a)の毛包の長さ 1μm あたりの BrdU 陽性細胞の定量化（それぞれ 4 個体から n=83 毛包（PBS 群）、95 毛包（1.8mM $CaCl_2$ 群）、97 毛包（9mM $CaCl_2$ 群））。データはバイオリンプロットとして示す。一元配置分散分析後に Tukey の検定。NS：有意差なし。

Col7a1$^{-/-}$マウスと同様に、$CaCl_2$投与マウスの非病変部の皮膚では、基底層の角化細胞の形態は、対照群の角化細胞の形態と類似していた（P2、図 5G(a)(b)の非病変部）。しかし、再生上皮の角化細胞は対照群の角化細胞ほど平坦ではなく立方体状であり（P2、図 5G(a)(b)の病変領域）、水疱治癒遅延と相関していた。

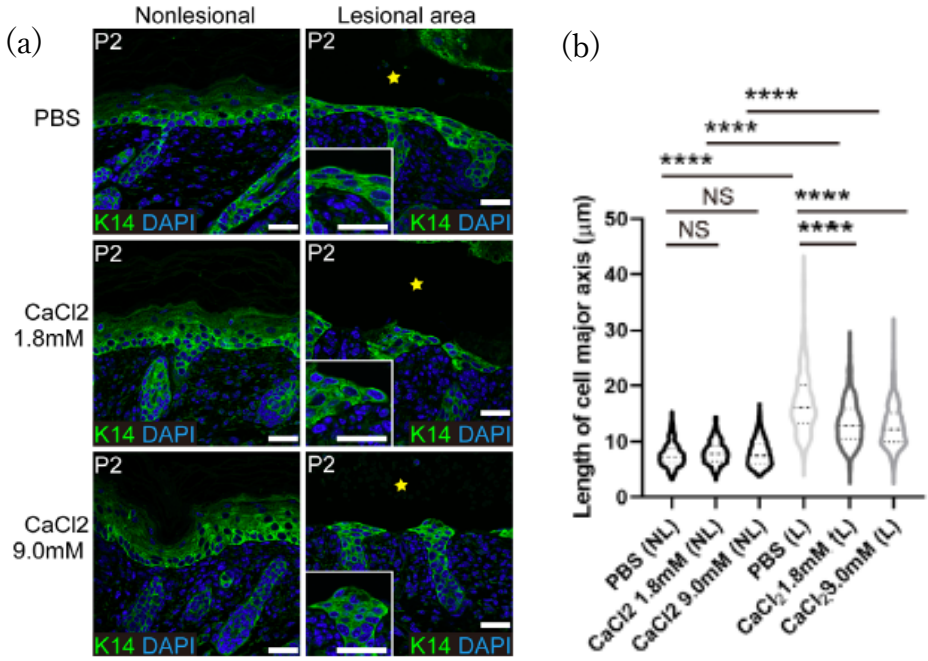


図 5G　$CaCl_2$投与マウスの再生上皮角化細胞の形態

(a) 図 5E(b)より再掲。P2 の $CaCl_2$投与マウス（中、下）および PBS 投与同腹仔対照マウス（上）の水疱の、K14（強拡大像、非病変部（左）および病変部（右））染色。星：水疱。Scale bar: 30μm。

(b) (a)の再生上皮角化細胞（PBS 群の病変部 433 細胞、1.8mM $CaCl_2$群の病変部 451 細胞、9mM $CaCl_2$群 425 細胞、それぞれ 4 個体）および水疱周囲の正常表皮角化細胞（基底細胞; PBS 群の非病変部 311 細胞、1.8mM $CaCl_2$群の非病変部 279 細胞、9mM $CaCl_2$群の非病変部 302 細胞、それぞれ 4 個体）。NL：非病変部。L：病変部。 データはバイオリンプロットで示す。****P< 0.0001、一元配置分散分析後に Tukey の検定。NS：有意差なし。

6.　数理モデルは水疱治癒過程を再現する

以上の実験動物を用いたデータから、毛包の発生停止中の毛包及び毛包間表皮の細胞増殖および再生上皮細胞の形態変化が、表皮下水疱治癒の動態を再現できるのではないかと仮説をたてた。この仮説に答えるために、我々は数理モデルを利用した。数理モデルとして、エージェントベースモデル（Kobayashi et al., 2016; Kobayashi et al., 2018）を採用した。このモデルでは、角化細胞が回転楕円体によって表され、細胞分裂は回転楕円体の複製として表現される。このモデルによって、表皮基底層の動態を視覚化し、基底膜上に表皮欠損を作出した。実験動物データから、毛包と毛包間表皮角化細胞の BrdU 陽性細胞数の比（表皮の長さの単位あたり約 7：1; 図 3A(a)）および再生上皮と正常角化細胞の長軸の長さの比（2：1; 図 5D(b)、5G(b)）に関する結果を利用した。系統追跡実験（図 3B-D）で見られたように、毛包由来細胞を表す表皮欠損内の幹細胞（赤）は、毛包間表皮幹細胞（黄）よりも創傷治癒に大きく寄与した（図 6A(a)(b)）。

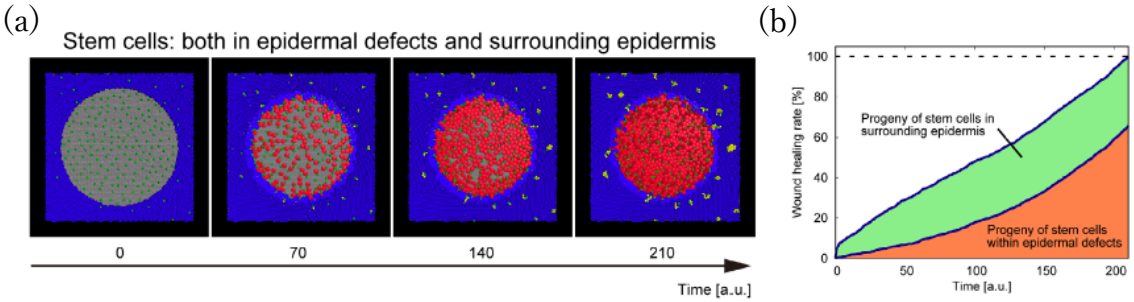


図 6A　野生型マウスの表皮下水疱の数理モデル

(a) 基底層での表皮下水疱治癒の粒子ベースモデル。細胞分裂しない表皮基底細胞（青）が基底膜（灰）上に配置される。幹細胞（緑）は、表皮欠損内あるいは周囲の表皮に系譜細胞を供給する（毛包由来細胞：赤、毛包間表皮由来細胞：黄）。時間[arb. unit]。
(b) 表皮欠損内または辺縁表皮のそれぞれの系譜細胞の表皮下水疱治癒への寄与。初めの表皮欠損に対するそれぞれの系譜細胞が占める面積の比率として計算される。

表皮欠損内に幹細胞が存在しないモデルは、創傷部における毛包の減少を再現するものであり、*Col17a1*$^{-/-}$マウスの創傷治癒過程の結果（図 4B-D）と一致して治癒遅延を示した（図 6B(a)(b)）。

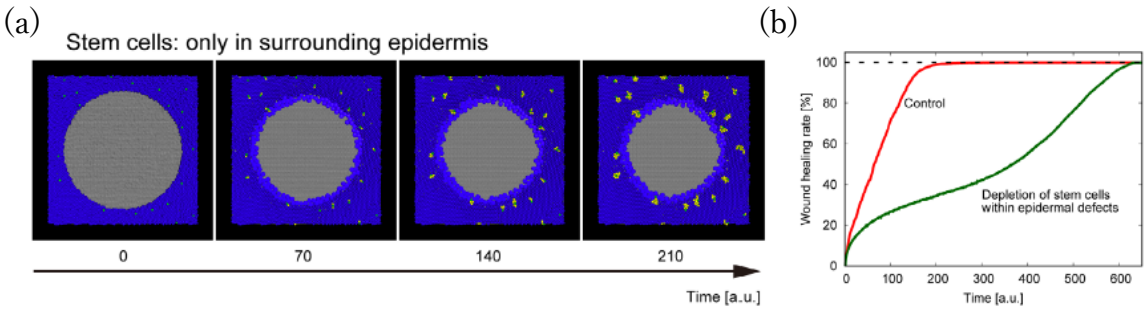


図 6B　*Col17a1*$^{-/-}$マウスの表皮下水疱の数理モデル

(a) 表皮欠損内に幹細胞が存在しない表皮下水疱治癒のモデル。

(b) コントロール（図 6A(a)）および幹細胞が存在しないモデル（図 6B(a)）における表皮下水疱治癒の時間経過。

Col7a1$^{-/-}$及び $CaCl_2$ 投与マウスの水疱治癒過程（再生上皮角化細胞と正常角化細胞の長さの比　1.3-1.6：1; 図 5H、5K）を再現する、再生上皮角化細胞の平坦化が障害されるモデルでは、上皮の再生が遅延した（図 6C (a), (b)）。

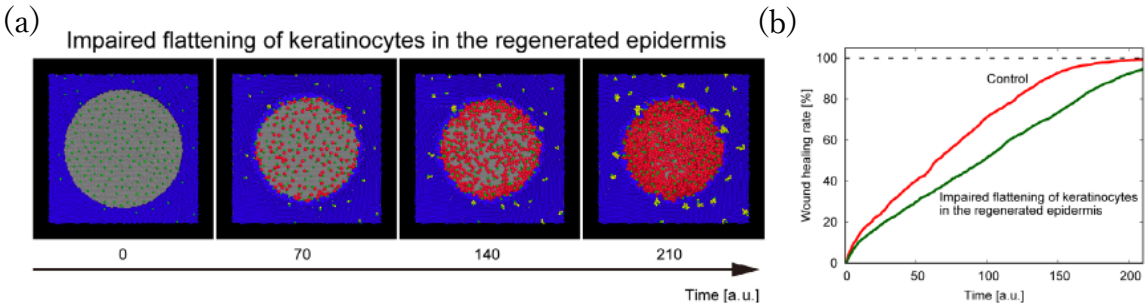


図 6C　*Col7a1*$^{-/-}$マウスおよび $CaCl_2$ 投与マウスの表皮下水疱の数理モデル

(a) 表皮再生における角化細胞の平坦化障害の影響。再生上皮と周囲皮膚のおける基底層の角化細胞の直径（回転楕円体の長軸)の比は 1.5:1 として計算した（図 6A(a)では 2:1)。

(b) コントロール（図 6A(a)）および細胞の平坦化が小さいモデル（図 6C(a)）における表皮下水疱治癒の時間経過。

幹細胞の初期分布により、結果が左右される可能性を否定するために、種々の分布での水疱治癒をシミュレーションした（図 6D(a)）。いずれの初期幹細胞分布においても図 6C の結果を再現できし、平坦化の小さいモデルでは上皮化が遅延した （図 6D(b)(c)）。以上の数理モデルの結果は、毛包幹細胞の系譜細胞の寄与と再生上皮角化細胞の形態変化が、in vivo での表皮下水疱治癒を再現するのに十分であることを示している。

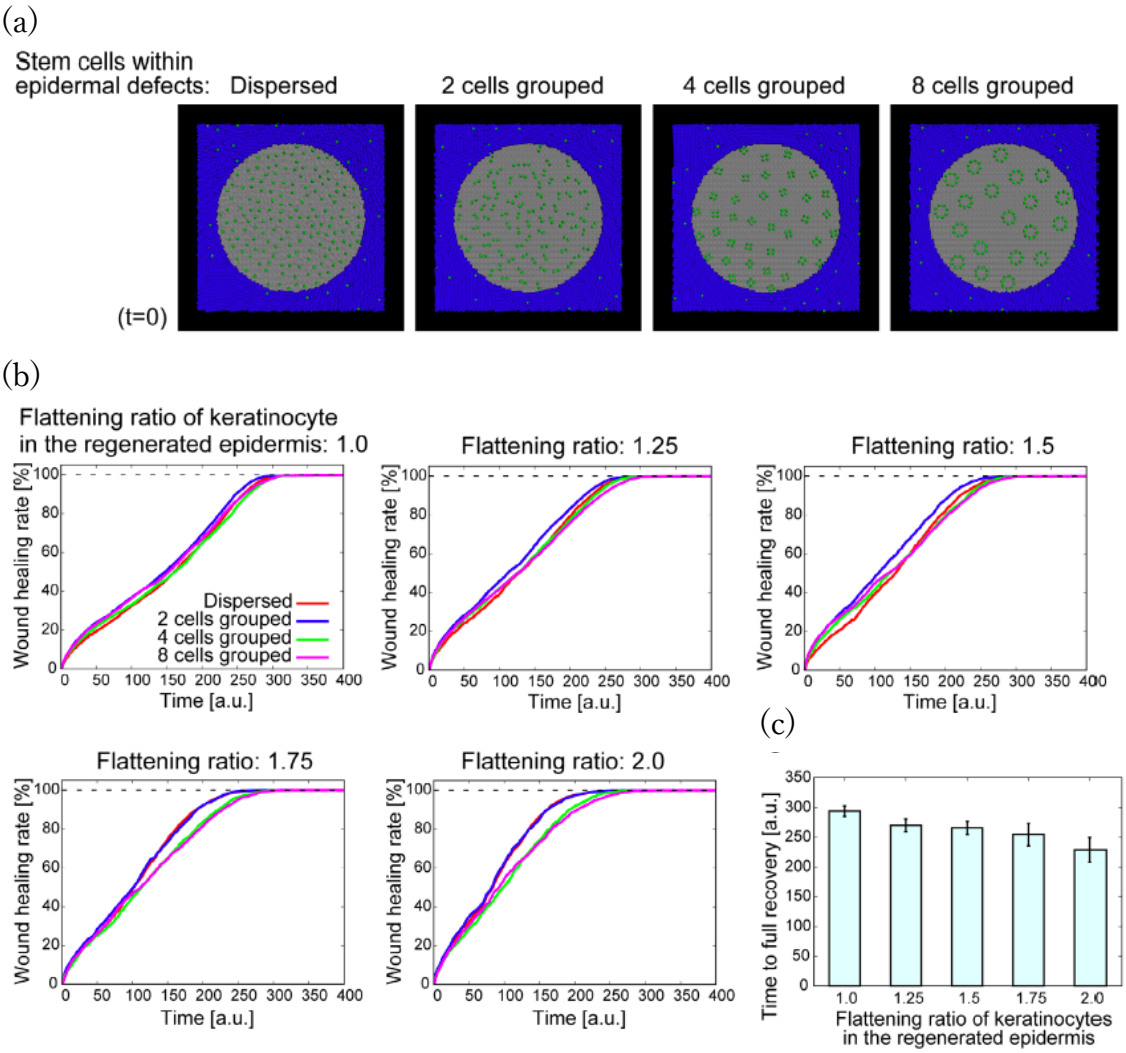


図 6D　表皮下水疱治癒の扁平率と幹細胞配置への依存性

(a) t=0 での表皮欠損内の幹細胞の配置（分散、2 細胞群、4 細胞群、8 細胞群）。

(b) 異なる角化細胞の平坦化率（1.0-2.0）における表皮下水疱治癒の時間経過。それぞれ(a)の 4 種類の幹細胞配置で行った。

(c) 異なる角化細胞の平坦化率の完全回復（100%上皮化）までの時間(4 種類の幹細胞配置の平均)。データは平均±SD として示す。

最後に、マウスにおける表皮下水疱治癒への毛包の寄与が、ヒトでも同様に見られるか検討した。ヒトの毛包はマウスより密度が低いが、サイズは著明に大きい。（表 6）（Otberg et al., 2004; Slee J, 1962; Yano et al., 2001; Saxena and Savant, 2017; Azar et al., 2015）。ヒトの表皮下水疱検体を調べたところ、毛包からの再上皮化が観察できた（図 6E）。これらの所見はマウスのデータと一致する。

	Human (adult, body)	Mouse (P1, dorsal skin)
HF density	14-32/cm^2	12-19/1.2 mm epidermis
HF diameter	80-170 μm	40 μm
HF depth	1-4 mm	100 μm

表 6　ヒトとマウスの毛包の比較

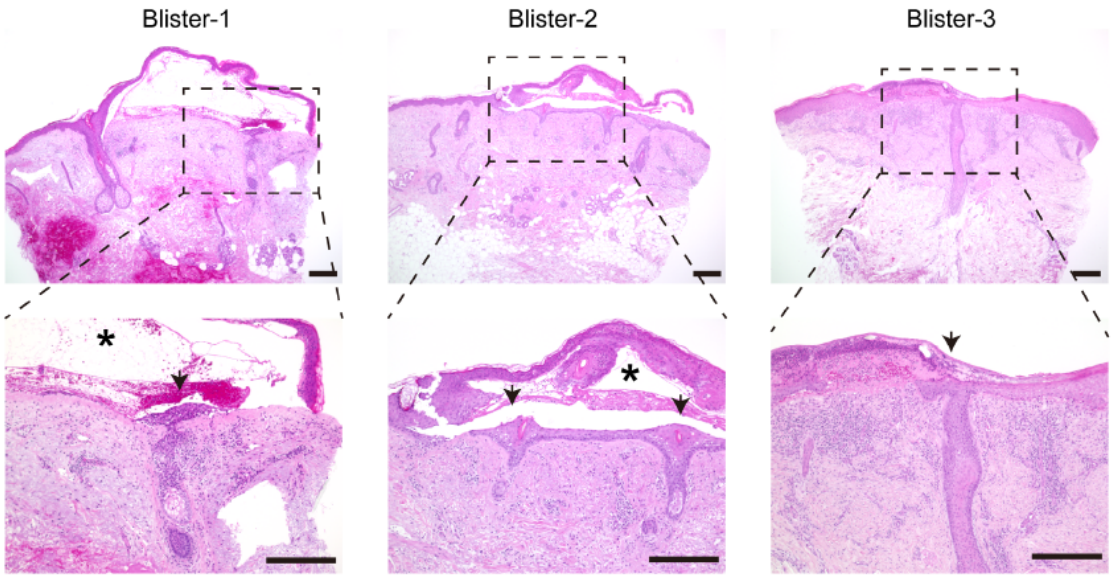


図 6E　ヒトの表皮下水疱の治癒

再上皮化領域が見られるヒト表皮下水疱検体の H&E 染色（Blister-1、2、3）。星：水疱。矢印：毛包からの再生上皮。Scale bar: 300μm。

考察

近年の研究では、損傷を受けた成体組織が胎生期に類似した状態に移行すると報告されているが、組織の再生が発生にどう影響するかについて不明であった。本研究では、水疱による創傷を新生仔マウスの背部皮膚に作出することで、組織再生の条件下では接合部毛包幹細胞の系譜細胞が毛包の成長よりも創傷治癒に寄与することを示した（図 7）。

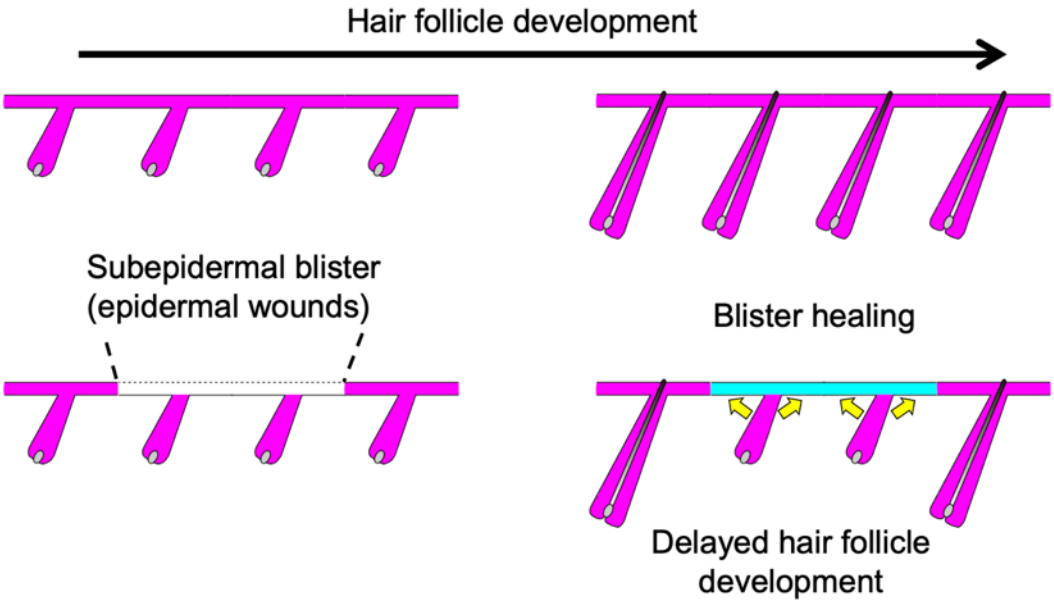


図 7　毛包の発生と創傷治癒の関係

（上）毛包の発生。（左下）発生期の毛包に表皮下水疱（表皮の損傷）を生じると、（右下）毛包が水疱の治癒に寄与して発生が遅延する。

マウス皮膚の運命決定と創傷実験を組み合わせたこれまでの研究では、創傷治癒における上皮、間葉、免疫細胞の関与が示されてきた（Dekoninck and Blanpain, 2019; Rognoni and Watt, 2018）。しかし、全層皮膚創傷は、新生仔の皮膚に適用された場合でも、すべての皮膚成分を除去するため、創傷が発生に与える影響を観察することは困難であり、逆もまた同様である。我々の水疱による創傷は、表皮のみが一定の陰圧によって除去され、他の皮膚成分と基底膜が創傷部に保存されるという点で、従来の皮膚創傷研究よりも優れている。これにより、発生期の「純粋な」表皮創傷治癒過程を調べることが可能となった。我々の研究は、創傷に誘発された胎生遺伝子発現（Miao et al., 2019）、成体マウスの全層皮膚創傷における毛包新生（Ito et al., 2007; Osaka et al., 2007）、新生仔マウスにおける毛包新生（Rognoni et al., 2016）とは対照的である。

これまでのところ、我々の研究では、Wnt シグナル伝達の低下が毛包発生の遅延の原因なのかあるいは結果なのか判別できない。この問題点の解決には今後のさらなる研究が必要である。

過去の研究では、ヒトのサクションブリスター法による水疱における、再上皮化（Lane et al., 1991）、皮膚裂隙部の細胞外マトリックス変化（Hertle et al、1992; Leivo et al、2000）に毛包が関与している可能性が示唆されてきた。他の毛包細胞集団の関与を完全に除外することはできないが、今回我々は、接合部毛包幹細胞の系譜細胞が主に表皮下水疱を修復することを示した（図 3C、6A）。これに対して、毛包間表皮は、ほとんどの毛包が真皮から剥離した際に表皮欠損を修復するための角化細胞を供給する（図 4D）。水疱治癒への角化細胞の 2 つの供給源の寄与がどのように調節されるかは不明だが、毛包は水疱底に密に分布するため、接合部毛包幹細胞の水疱治癒に対する寄与は理解しやすい。対照的に、毛包間表皮幹細胞の系譜細胞は、数理モデルによって示されるように、水疱の辺縁からのみ治癒に寄与することができる（図 3B、6A）。接合部毛包幹細胞の水疱治癒に対する貢献は、Wnt シグナル関連分子の発現低下（図 2A-D）と、再生上皮における毛包の成長遅延によっても裏付けられる。これらの結果は、組織発生と創傷治癒との間に協調的なバランスが存在することを示している。また、RNA シーケンスのデータで表皮再生部位の IL-17 関連遺伝子群の発現が上昇していたが、免疫細胞の動員は水疱形成の 1 日後または 3 日後には明らかではなかった（図 2E）。最近、IL-17 シグナル伝達は、創傷治癒および腫瘍形成において Lrig1 系統追跡細胞の動員を促進すると報告された（Chen et al., 2019）。したがって、我々の研究において観察された IL-17 関連遺伝子の発現上昇は、Lrig1 系統追跡細胞が毛包から移動して表皮欠損を修復するのに作用している可能性がある（図 3C）。

細胞骨格の変化は、細胞形態と遊走能に直接影響する（Tang & Gerlach, 2017）。これまでの研究では、遊走細胞の前縁（Uroz et al、2019）、あるいは創傷治癒過程の再生上皮の角化細胞で（Krawczyk、1971; Paladini et al、1996）、細胞が楔状あるいは平坦に形態変化することが知られている。我々の研究では、*Col7a1*$^{-/-}$マウスおよび $CaCl_2$ 投与マウスでの水疱形成実験と数理モデルを通じて、角化細胞の形態変化が in vivo の創傷治癒に重要な影響を及ぼすことを明らかにした（図 5D、5G、6C）。ただし、角化細胞の形態学的変化は、水疱の治癒の促進に直接影響するのではなく、表皮の再生を助ける他の主要な原因と単に相関している可能性が残る。また、*Col7a1*$^{-/-}$の水疱底部の機能的な基底膜の喪失は、細胞遊走のための足場となる基質が不足していることによって水疱治癒を遅延させる可能性がある。我々が本研究で提起した仮説をさらに検証して確証付けるには、更なる基礎的な研究が必要である。

我々の実験動物を用いた水疱作出実験は、表皮下水疱が表皮の創傷であるため、細胞生物学の分野で数十年にわたって使用されてきた培養細胞における創傷治癒アッセイ

（例えば、scratch wounding など）を模倣している。特に、細胞外カルシウム投与（図5E）に例示されるような薬物の水疱内投与は、scratch wounding アッセイの代替となり得る。

我々のサクションブリスターモデルは、表皮水疱症、類天疱瘡群、熱傷、スティーブンス・ジョンソン症候群/中毒性表皮壊死症などの重症薬疹で見られる、ヒトの病理学的表皮剥離を再現できる。*COL17A1*（McGrath et al., 1995）および *COL7A1*（Christiano et al., 1993; Hilal et al., 1993）の機能喪失型変異は、それぞれヒトの接合部型および劣性栄養障害型の表皮水疱症を引き起こす。したがって、*Col17a1*$^{-/-}$マウスおよび *Col7a1*$^{-/-}$マウスの水疱形成は、表皮水疱症の創傷モデルである。ヒト *COL17A1* 変異による接合部型表皮水疱症の顕著な脱毛は、*Col17a1*$^{-/-}$マウスで見られる水疱底からの毛包の減少を反映しており（図 4B）、一方で劣性栄養障害型表皮水疱症の脱毛はそれほど重度ではなく（Tosti et al., 2010）、*Col7a1*$^{-/-}$マウスの水疱底の真皮において毛包が維持される結果と一致している（図 5C(a)）。特に劣性栄養障害型表皮水疱症においては、繰り返す水疱形成が毛包幹細胞の貯蔵を枯渇化し、水疱の治癒遅延と瘢痕化につながる可能性がある。我々の表皮下水疱治癒の実験結果から、表皮水疱症および他の水疱性疾患の治療標的として毛包が注目される。

我々の研究にはいくつか欠点があり、これらは主にマウスとヒトの種間の違いに起因する。まず、ヒトにおいてはエクリン汗腺が皮膚の創傷治癒に寄与することが報告されている（Rittie et al., 2013）。マウスの背部皮膚には汗腺が存在しないため、我々の研究ではヒトでみられるような汗腺の創傷治癒への寄与を推定することができない。第二に、ヒトの劣性栄養障害型表皮水疱症の皮膚の裂隙は、我々の研究でみられた *Col7a1*$^{-/-}$マウスの水疱と同様、lamina densa（基底膜）の直下にあるが、ヒト劣性栄養障害型表皮水疱症のサクションブリスター法による水疱では、ヘミデスモソームと lamina densa の間の lamina lucida で皮膚が剥離すると報告されている（Tidman &Eady, 1984）。さらに我々の研究では、表皮水疱症に関する先行研究で示されている間葉系細胞の水疱治癒への寄与（Chino et al., 2008; Fujita et al., 2010; Iinuma et al., 2015; Tamai et al., 2011; Tolar et al., 2009; Webber et al., 2017）について解析していない。水疱治癒における間葉系細胞の役割を解明するためにはさらなる研究が必要である。

結論

我々の研究では以下の知見が得られ、皮膚の表皮下水疱における発生と創傷の再生の間の不均衡および再生上皮の形態変化の重要性を明らかにした。

・サクションブリスターモデルは表皮の創傷治癒過程の観察に非常に有用であり、また、表皮下水疱内に発生期の毛包が存在するため、創傷における発生と再生の両者を評価することができる。
・同モデルの表皮下水疱の治癒過程においては、毛包の発生を犠牲にしながら上皮を再生する。
・表皮下水疱の上皮化には接合部毛包幹細胞の寄与が大きく、毛包間表皮幹細胞は水疱の辺縁の上皮化にわずかに寄与するのみである。
・表皮下水疱部の毛包が減少すると創傷治癒は遅延し、毛包間表皮幹細胞の寄与が大きくなる。
・再生上皮の遊走における形態学的変化は、再上皮化の促進のための重要な因子である。
・表皮下水疱内への薬剤投与実験が可能である。
・我々の表皮下水疱治癒モデルは数理モデルによるシミュレーションが可能である。

本研究はさらに、数理モデルを用いて創傷治癒過程のより詳細な経時的変化を予測することが可能であり、表皮下水疱治癒における上皮細胞の形態解析、機能解析を組み合わせることでさらに詳細な創傷治癒メカニズムを調べることができる。また、系統追跡法を用いて他の幹細胞集団の創傷治癒への寄与を評価することで、様々な幹細胞集団の役割を解明することも可能である。加えて、他の水疱症モデルマウスへの応用、ヒトの水疱治癒過程の詳細な観察によって、水疱性疾患の病態解明に寄与し、水疱内への薬剤投与実験などを組み合わせることによって、詳細なメカニズムの解明や治療介入への道を開くものである。

汗腺の創傷治癒への寄与を無視できないヒトの創傷治癒への応用、ヒト表皮水疱症とマウスモデルにおける水疱の裂隙レベルの違いの理由の解明、免疫細胞や間葉系細胞の創傷治癒への寄与の解明などが今後の課題である。

謝辞

本研究では以下の研究者に協力していただきました。深く御礼申し上げます。

動物実験と解析：渡邉美佳、高島翔太、中村秀樹、小住英之、王　禹楠、眞井洋輔、氏家英之、岩田浩明、西江　渉

網羅的遺伝子発現解析：Andrea Lauria、Valentina Proserpio、Salvatore Oliviero、Giacomo Donati

数理モデル：大野航太、小林康明、長山雅晴

実験の指導、統括： 氏家英之、清水　宏、夏賀　健

技術支援：吉田芽亜利、竹原　恵

実験動物の供与：相賀裕美子、Kim B Yancey、Jouni Uitto

（全て敬称略）

本研究は、AMED（ID：20ek0109380h0003）、JSPS（KAKEN 17K16317）、上原財団、Lydia O'Leary Memorial Pias Dermatological Foundation、JST CREST（JPMJCR15D2）、JSPS（KAKEN 16K10120）、AIRC IG 20240、AIRC MFAG 2018（ID：21640）の資金提供を受けて行われました。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Aragona, M., Dekoninck, S., Rulands, S., Lenglez, S., Mascre, G., Simons, B. D., and Blanpain C. (2017). Defining stem cell dynamics and migration during wound healing in mouse skin epidermis. Nat. Commun. *8*, 14684.

Azar, R. P., Thomas, A. H., and Lindner, G. (2015). Hair Follicle Plasticity with Complemented Immune-modulation Following Follicular Unit Extraction. Int. J. Trichology. *7*, 16-23.

Brakebusch, C., Grose, R., Quondamatteo, F., Ramirez, A., Jorcano, J. L., Pirro, A., Svensson, M., Herken, R., Sasaki, T., Timpl, R., et al. (2000). Skin and hair follicle integrity is crucially dependent on beta 1 integrin expression on keratinocytes. EMBO J. *19*, 3990-4003.

Chen, M., Kasahara, N., Keene, D. R., Chan, L., Hoeffler, W. K., Finlay, D., Barcova, M., Cannon, P. M., Mazurek, C., and Woodley, D. T. (2002). Restoration of type VII collagen expression and function in dystrophic epidermolysis bullosa. Nat. Genet. *32*, 670-675.

Chen, M., O'Toole, E. A., Muellenhoff, M., Medina, E., Kasahara, N., and Woodley, D. T. (2000). Development and characterization of a recombinant truncated type VII collagen "minigene". Implication for gene therapy of dystrophic epidermolysis bullosa. J. Biol. Chem. *275*: 24429-24435.

Chen, X., Cai, G., Liu, C., Zhao, J., Gu, C., Wu, L., Hamilton, T. A., Zhang, C. J., Ko, J., Zhu, L. et al. (2019). IL-17R-EGFR axis links wound healing to tumorigenesis in Lrig1(+) stem cells. J. Exp. Med. *216*, 195-214.

Chetty, B. V., Boissy, R. E., Warden, G. D., and Nordlund, J. J. (1992). Basement membrane and fibroblast aberration in blisters at the donor, graft, and spontaneously healed sites in patients with burns. Arch. Dermatol. *128*, 181-186.

Chino, T., Tamai, K., Yamazaki, T., Otsuru, S., Kikuchi, Y., Nimura, K., Endo, M., Nagai, M., Uitto, J., Kitajima, Y. et al. (2008). Bone marrow cell transfer into fetal circulation can ameliorate genetic skin diseases by providing fibroblasts to the skin and inducing

immune tolerance. Am. J. Pathol. *173*, 803-814.

Christiano, A. M., Greenspan, D. S., Hoffman, G. G., Zhang, X., Tamai, Y., Lin, A. N., Dietz, H. C., Hovnanian, A., and Uitto, J. (1993). A missense mutation in type VII collagen in two affected siblings with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. Nat. Genet. *4*, 62-66.

Dekoninck, S., and Blanpain, C. (2019). Stem cell dynamics, migration and plasticity during wound healing. Nat. Cell Biol. *21*, 18-24.

Donati, G., Rognoni, E., Hiratsuka, T., Liakath-Ali, K., Hoste, E., Kar, G., Kayikci, M., Russell, R., Kretzschmar, K., Mulder, K. W. et al. (2017). Wounding induces dedifferentiation of epidermal Gata6(+) cells and acquisition of stem cell properties. Nat. Cell Biol. *19*, 603-613.

Donati, G., and Watt, F. M. (2015). Stem cell heterogeneity and plasticity in epithelia. Cell Stem Cell. *16*, 465-476.

Fernandez, Vallone, V., Leprovots, M., Strollo, S., Vasile, G., Lefort, A., Libert, F., Vassart, G., and Garcia, M. I. (2016). Trop2 marks transient gastric fetal epithelium and adult regenerating cells after epithelial damage. Development. *143*, 1452-1463.

Fine, J. D., Bruckner-Tuderman, L., Eady, R. A., Bauer, E. A., Bauer, J. W., Has, C., Heagerty, A., Hintner, H., Hovnanian, A., Jonkman, M. F. et al. (2014). Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification. J. Am. Acad. Dermatol. *70*, 1103-1126.

Fujita, Y., Abe, R., Inokuma, D., Sasaki, M., Hoshina, D., Natsuga, K., Nishie, W., McMillan, J. R., Nakamura, H., Shimizu, T. et al (2010) Bone marrow transplantation restores epidermal basement membrane protein expression and rescues epidermolysis bullosa model mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. *107*, 14345-14350.

Garcin, C. L., Ansell, D. M., Headon, D. J., Paus, R., and Hardman, M. J. (2016). Hair Follicle Bulge Stem Cells Appear Dispensable for the Acute Phase of Wound Re-epithelialization. Stem Cells. *34*, 1377-1385.

Gay, D., Kwon, O., Zhang, Z., Spata, M., Plikus, M. V., Holler, P. D., Ito, M., Yang, Z., Treffeisen, E., Kim, C. D. et al. (2013). Fgf9 from dermal gammadelta T cells induces hair follicle neogenesis after wounding. Nat. Med. *19*, 916-923.

Gonzales, K. A. U., and Fuchs, E. (2017). Skin and Its Regenerative Powers: An Alliance between Stem Cells and Their Niche. Dev Cell 43: 387-401

Heinonen S, Mannikko M, Klement JF, Whitaker-Menezes D, Murphy GF, Uitto J (1999) Targeted inactivation of the type VII collagen gene (Col7a1) in mice results in severe blistering phenotype: a model for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. J. Cell Sci. *112* (Pt 21), 3641-3648.

Hennings, H., Michael, D., Cheng, C., Steinert, P., Holbrook, K., and Yuspa, S. H. (1980). Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. Cell. *19*, 245-254.

Hertle, M. D., Kubler, M. D., Leigh, I. M., and Watt, F. M. (1992). Aberrant integrin expression during epidermal wound healing and in psoriatic epidermis. J. Clin. Invest. *89*, 1892-1901.

Hilal, L., Rochat, A., Duquesnoy, P., Blanchet-Bardon, C., Wechsler, J., Martin, N., Christiano, A. M., Barrandon, Y., Uitto, J., Goossens, M. et al. (1993). A homozygous insertion-deletion in the type VII collagen gene (COL7A1) in Hallopeau-Siemens dystrophic epidermolysis bullosa. Nat. Genet. *5*, 287-293.

Iinuma, S., Aikawa, E., Tamai, K., Fujita, R., Kikuchi, Y., Chino, T., Kikuta, J., McGrath, J. A., Uitto, J., Ishii, M. et al. (2015). Transplanted bone marrow-derived circulating PDGFRalpha+ cells restore type VII collagen in recessive dystrophic epidermolysis bullosa mouse skin graft. J. Immunol. *194*, 1996-2003.

Ito, M., Liu, Y., Yang, Z., Nguyen, J., Liang, F., Morris, R. J., and Cotsarelis, G. (2005). Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. Nat. Med. *11*, 1351-1354.

Ito, M., Yang, Z., Andl, T., Cui, C., Kim, N., Millar, S. E., and Cotsarelis, G. (2007). Wnt-

dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. Nature *447*, 316-320.

Iwata, H., Bieber, K., Tiburzy, B., Chrobok, N., Kalies, K., Shimizu, A., Leineweber, S., Ishiko, A., Vorobyev, A., Zillikens, D. et al. (2013). B cells, dendritic cells, and macrophages are required to induce an autoreactive CD4 helper T cell response in experimental epidermolysis bullosa acquisita. J. Immunol. *191*, 2978-2988.

Janich, P., Toufighi, K., Solanas, G., Luis, N. M., Minkwitz, S., Serrano, L., Lehner, B., and Benitah, S. A. (2013). Human epidermal stem cell function is regulated by circadian oscillations. Cell Stem Cell *13*, 745-753.

Kang, S., Long, K., Wang, S., Sada, A., and Tumbar, T. (2020). Histone H3 K4/9/27 Trimethylation Levels Affect Wound Healing and Stem Cell Dynamics in Adult Skin. Stem Cell Reports. *14*, 34-48.

Kiistala, U., and Mustakallio, K. K. (1964). In-Vivo Separation of Epidermis by Production of Suction Blisters. Lancet. *2*, 1444-1445.

Kiistala, U., and Mustakallio, K. K. (1967). Dermo-epidermal separation with suction. Electron microscopic and histochemical study of initial events of blistering on human skin. J. Invest. Dermatol. *48*, 466-477.

Kim, D., Langmead, B., and Salzberg, S. L. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. Nat. Methods. *12*, 357-360.

Kobayashi, Y., Sawabu, Y., Kitahata, H., Denda, M., and Nagayama, M. (2016). Mathematical model for calcium-assisted epidermal homeostasis. J. Theor. Biol. *397*, 52-60.

Kobayashi, Y., Yasugahira, Y., Kitahata, H., Watanabe, M., Natsuga, K., and Nagayama, M. (2018). Interplay between epidermal stem cell dynamics and dermal deformation. npj Computational Materials. *4*, 45.

Krawczyk, W. S. (1971). A pattern of epidermal cell migration during wound healing. J.

Cell Biol. *49*, 247-263.

Lane, E. B., Wilson, C. A., Hughes, B. R., and Leigh, I. M. (1991). Stem cells in hair follicles. Cytoskeletal studies. Ann. N. Y. Acad. Sci. *642*, 197-213.

Leivo, T., Kiistala, U., Vesterinen, M., Owaribe, K., Burgeson, R. E., Virtanen, I., and Oikarinen, A. (2000). Re-epithelialization rate and protein expression in the suction-induced wound model: comparison between intact blisters, open wounds and calcipotriol-pretreated open wounds. Br. J. Dermatol. *142*, 991-1002.

Liao, Y., Smyth, G. K., and Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. Bioinformatics. *30*, 923-930.

Liu, N., Matsumura, H., Kato, T., Ichinose, S., Takada, A., Namiki, T., Asakawa, K., Morinaga, H., Mohri, Y., De Arcangelis, A. et al. (2019) Stem cell competition orchestrates skin homeostasis and ageing. Nature. *568*, 344-350.

Magee, A. I., Lytton, N. A., and Watt, F. M. (1987). Calcium-induced changes in cytoskeleton and motility of cultured human keratinocytes. Exp. Cell Res. *172*, 43-53.

Matsumura, H., Mohri, Y., Binh, N. T., Morinaga, H., Fukuda, M., Ito, M., Kurata, S., Hoeijmakers, J., and Nishimura, E. K. (2016). Hair follicle aging is driven by transepidermal elimination of stem cells via COL17A1 proteolysis. Science. *351*, aad4395.

McGrath, J. A., Gatalica, B., Christiano, A. M., Li, K., Owaribe, K., McMillan, J. R., Eady, R. A., and Uitto, J. (1995). Mutations in the 180-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG2), a hemidesmosomal transmembrane collagen (COL17A1), in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. Nat. Genet. *11*, 83-86.

McMillan, J. R., Akiyama, M., and Shimizu, H. (2003). Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions. J. Dermatol. Sci. *31*, 169-177.

Miao, Q., Hill, M. C., Chen, F., Mo, Q., Ku, A. T., Ramos, C., Sock, E., Lefebvre, V., and

Nguyen, H. (2019). SOX11 and SOX4 drive the reactivation of an embryonic gene program during murine wound repair. Nat. Commun. *10*, 4042.

Moriyama, A., Kii, I., Sunabori, T., Kurihara, S., Takayama, I., Shimazaki, M., Tanabe, H., Oginuma, M., Fukayama, M., Matsuzaki, Y. et al. (2007). GFP transgenic mice reveal active canonical Wnt signal in neonatal brain and in adult liver and spleen. Genesis. *45*, 90-100.

Natsuga K. (2014). Epidermal barriers. Cold Spring Harb. Perspect. Med. *4*, a018218.

Natsuga, K., Cipolat, S., and Watt, F. M. (2016). Increased Bacterial Load and Expression of Antimicrobial Peptides in Skin of Barrier-Deficient Mice with Reduced Cancer Susceptibility. J. Invest. Dermatol. *136*, 99-106.

Natsuga, K., Watanabe, M., Nishie, W., and Shimizu, H. (2019). Life before and beyond blistering: The role of collagen XVII in epidermal physiology. Exp. Dermatol. *28*, 1135-1141.

Niculescu, C., Ganguli-Indra, G., Pfister, V., Dupe, V., Messaddeq, N., De Arcangelis, A., and Georges-Labouesse, E. (2011). Conditional ablation of integrin alpha-6 in mouse epidermis leads to skin fragility and inflammation. Eur. J. Cell Biol. *90*, 270-277.

Nishie, W., Sawamura, D., Goto, M., Ito, K., Shibaki, A., McMillan, J. R., Sakai, K., Nakamura, H., Olasz, E., Yancey, K. B. et al. (2007). Humanization of autoantigen. Nat. Med. *13*, 378-383.

Nusse, Y. M., Savage, A. K., Marangoni, P., Rosendahl-Huber, A. K. M., Landman, T. A., de Sauvage, F. J., Locksley, R. M., and Klein, O. D. (2018). Parasitic helminths induce fetal-like reversion in the intestinal stem cell niche. Nature. *559*, 109-113.

Nystrom, A., Velati, D., Mittapalli, V. R., Fritsch, A., Kern, J. S., and Bruckner-Tuderman, L. (2013). Collagen VII plays a dual role in wound healing. J. Clin. Invest. 123, 3498-3509.

Osaka, N., Takahashi, T., Murakami, S., Matsuzawa, A., Noguchi, T., Fujiwara, T.,

Aburatani, H., Moriyama, K., Takeda, K., and Ichijo, H. (2007). ASK1-dependent recruitment and activation of macrophages induce hair growth in skin wounds. J. Cell Biol. *176*, 903-909.

Otber, N., Richter, H., Schaefer, H., Blume-Peytavi, U., Sterry, W., and Lademann, J. (2004). Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. J. Invest. Dermatol. *122*, 14-19.

Page, M. E., Lombard, P., Ng, F., Gottgens, B., and Jensen, K. B. (2013). The epidermis comprises autonomous compartments maintained by distinct stem cell populations. Cell Stem Cell. *13*, 471-482.

Paladini, R. D., Takahashi, K., Bravo, N. S., and Coulombe, P. A. (1996). Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. J. Cell Biol. *132*, 381-397.

Park, S., Gonzalez, D. G., Guirao, B., Boucher, J. D., Cockburn, K., Marsh, E. D., Mesa, K. R., Brown, S., Rompolas, P., Haberman, A. M. et al. (2017). Tissue-scale coordination of cellular behaviour promotes epidermal wound repair in live mice. Nat. Cell Biol. *19*, 155-163.

Paus, R., Muller-Rover, S., Van Der Veen, C., Maurer, M., Eichmuller, S., Ling, G., Hofmann, U., Foitzik, K., Mecklenburg, L., and Handjiski, B. (1999). A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis. J. Invest. Dermatol. *113*, 523-532.

Rittie, L., Sachs, D. L., Orringer, J. S., Voorhees, J. J., and Fisher, G. J. (2013). Eccrine sweat glands are major contributors to reepithelialization of human wounds. Am. J. Pathol. *182*, 163-171.

Robinson, M. D., McCarthy, D. J., and Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics. *26*, 139-140.

Rognoni, E., Gomez, C., Pisco, A. O., Rawlins, E. L., Simons, B. D., Watt, F. M., and Driskell, R. R. (2016). Inhibition of beta-catenin signaling in dermal fibroblasts enhances hair follicle regeneration during wound healing. Development. *143*, 2522-2535.

Rognoni, E., and Watt, F. M. (2018). Skin Cell Heterogeneity in Development, Wound Healing, and Cancer. Trends Cell Biol. *28*, 709-722.

Slee J. (1962). Developmental morphology of the skin and hair follicles in normal and in 'ragged' mice. J. Embryol. Exp. Morphol. *10*, 507-529.

Sada, A., Jacob, F., Leung, E., Wang, S., White, B. S., Shalloway, D., and Tumbar, T. (2016). Defining the cellular lineage hierarchy in the interfollicular epidermis of adult skin. Nat. Cell Biol. *18*, 619-631.

Saxena, K. and Savant, S. S. (2017). Body to Scalp: Evolving Trends in Body Hair Transplantation. Indian Dermatol. Online J. *8*, 167-175.

Saxena, N., Mok, K. W., and Rendl, M. (2019). An updated classification of hair follicle morphogenesis. Exp. Dermatol. *28*, 332-344.

Schmidt, E., and Zillikens, D. (2013) Pemphigoid diseases. Lancet. *381*, 320-332.

Shimizu, H., Ishiko, A., Masunaga, T., Kurihara, Y., Sato, M., Bruckner-Tuderman, L., and Nishikawa, T. (1997). Most anchoring fibrils in human skin originate and terminate in the lamina densa. Lab. Invest. *76*, 753-763.

Tamai, K., Yamazaki, T., Chino, T., Ishii, M., Otsuru, S., Kikuchi, Y., Iinuma, S., Saga, K., Nimura, K., Shimbo, T. et al. (2011). PDGFRalpha-positive cells in bone marrow are mobilized by high mobility group box 1 (HMGB1) to regenerate injured epithelia. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. *108*, 6609-6614.

Tang, D. D., and Gerlach, B. D. (2017). The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration. Respir. Res. *18*, 54.

Tanimura, S., Tadokoro, Y., Inomata, K., Binh, N. T., Nishie, W., Yamazaki, S., Nakauchi, H., Tanaka, Y., McMillan, J. R., Sawamura, D. et al. (2011). Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells. Cell Stem Cell. *8*, 177-187.

Tidman, M. J., and Eady, R. A. (1984). Evidence for a functional defect of the lamina lucida in recessive dystrophic epidermolysis bullosa demonstrated by suction blisters. Br. J. Dermatol. *111*, 379-387.

Tolar, J., Ishida-Yamamoto, A., Riddle, M., McElmurry, R. T., Osborn, M., Xia, L., Lund, T., Slattery, C., Uitto, J., Christiano, A. M. et al. (2009). Amelioration of epidermolysis bullosa by transfer of wild-type bone marrow cells. Blood. *113*, 1167-1174.

Tosti, A., Duque-Estrada, B., and Murrell, D. F. (2010). Alopecia in epidermolysis bullosa. Dermatol. Clin. *28*, 165-169.

Uroz, M., Garcia-Puig, A., Tekeli, I., Elosegui-Artola, A., Abenza, J. F., Marin-Llaurado, A., Pujals, S., Conte, V., Albertazzi, L., Roca-Cusachs, P. et al. (2019). Traction forces at the cytokinetic ring regulate cell division and polyploidy in the migrating zebrafish epicardium. Nat. Mater. *18*, 1015-1023.

Vahidnezhad, H., Youssefian, L., Saeidian, A. H., and Uitto, J. (2019). Phenotypic Spectrum of Epidermolysis Bullosa: The Paradigm of Syndromic versus Non-Syndromic Skin Fragility Disorders. J. Invest. Dermatol. *139*, 522-527.

Watanabe, M., Natsuga, K., Nishie, W., Kobayashi, Y., Donati, G., Suzuki, S., Fujimura, Y., Tsukiyama, T., Ujiie, H., Shinkuma, S. et al. (2017). Type XVII collagen coordinates proliferation in the interfollicular epidermis. Elife, *6*, e26635.

Watanabe, M., Natsuga, K., Shinkuma, S., and Shimizu, H. (2018). Epidermal aspects of type VII collagen: Implications for dystrophic epidermolysis bullosa and epidermolysis bullosa acquisita. J. Dermatol. *45*, 515-521.

Watt, F. M., and Fujiwara, H. (2011). Cell-extracellular matrix interactions in normal and diseased skin. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *3*, a005124.

Webber, B. R., O'Connor, K. T., McElmurry, R. T., Durgin, E. N., Eide, C. R., Lees, C. J., Riddle, M. J., Mathews, W. E., Frank, N. Y., Kluth, M. A. et al. (2017). Rapid generation of Col7a1(-/-) mouse model of recessive dystrophic epidermolysis bullosa and partial rescue via immunosuppressive dermal mesenchymal stem cells. Lab. Invest. *97*, 1218-1224.

White, K. D., Abe, R., Ardern-Jones, M., Beachkofsky, T., Bouchard, C., Carleton, B., Chodosh, J., Cibotti, R., Davis, R., Denny, J. C. et al. (2018). SJS/TEN 2017: Building Multidisciplinary Networks to Drive Science and Translation. J. Allergy Clin. Immunol. Pract. *6*, 38-69.

Yano, K., Brown, L. F., and Detmar, M. (2001). Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. J. Clin. Invest. *107*, 409-417.

Yu, G., Wang, L. G., Han, Y., and He, Q. Y. (2012). clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. OMICS. *16*, 284-287.

Yui, S., Azzolin, L., Maimets, M., Pedersen, M. T., Fordham, R. P., Hansen, S. L., Larsen, H. L., Guiu, J., Alves, M. R. P., Rundsten, C. F. et al. (2018). YAP/TAZ-Dependent Reprogramming of Colonic Epithelium Links ECM Remodeling to Tissue Regeneration. Cell Stem Cell. *22*, 35-49 e37.